



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**

**“Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarzensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay”**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Ingeniera  
Agrónoma

**AUTORAS:**

Quito Sinchi Angélica Noemí

C.I 0106657695

Yunga Yunga Ana Marlene

C.I 0105620207

**DIRECTORA:** Ing. Paulina Germania Villena Ochoa, MSc.

C.I 0102263860

**CUENCA, ECUADOR**

**24 /09/ 2019**



## RESUMEN

La tecnología de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio (llamada semilla sintética o artificial) es una alternativa exitosa para la propagación, multiplicación y conservación de especies. Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Propagación In Vitro de Plantas, Laboratorio de Semillas, e invernadero en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, nuestra investigación tuvo como objetivo principal evaluar la técnica de encapsulamiento de embriones cigóticos de dos especies ecológica y socioeconómicamente importantes: *Vasconcellea cundinamarcensis* (chamburo) y *Hyeronima macrocarpa* (motilón) y su respuesta en la germinación y conservación; para ello embriones cigóticos fueron extraídos de semillas en estado de madurez fisiológica y depositados en alginato de sodio al 4%, uno a uno los embriones fueron depositados en un agente complejante de cloruro de calcio en dos concentraciones de 50mM y 75mM y en dos tiempos de inmersión 10 y 30 minutos con el fin de generar una cubierta que cumpla la función de nutrir y proteger para facilitar la germinación. Posterior a esto se evaluó el efecto de estas variables en la viabilidad de los embriones encapsulados, en diferentes tiempos de almacenamiento 0, 20 y 40 días en los ambientes cámara germinadora e invernadero. Los mayores valores de germinación para *Vasconcellea cundinamarcensis* fue el tratamiento T4 (4% de alginato + 75mM de  $\text{CaCl}_2$ +30min) con 31,46%, mientras que para *Hyeronima macrocarpa* en el T4 (4% de alginato + 75mM de  $\text{CaCl}_2$ +30min) 33,30%. Aunque en esta especie no hubo diferencias significativas en los distintos tratamientos. Las semillas sintéticas fueron almacenadas durante 0, 20, 40 días a 4 y 25 grados centígrados y luego llevadas a condiciones de invernadero y cámara germinadora para su evaluación. Se observó una mejor germinación en condiciones de invernadero que en condiciones de la cámara germinadora. Con relación a los días de almacenamiento, *Vasconcellea cundinamarcensis* mostró el porcentaje de germinación a los (0 días) con 28,38% cuando fue sembrado directamente el embrión encapsulado en el invernadero, de igual manera para la especie *Hyeronima macrocarpa* con un porcentaje de 51,34%. Se obtuvo mejor desarrollo de las plántulas provenientes de los embriones encapsulados almacenados por 40 días a 25°C y luego sembrado en el invernadero. Los resultados obtenidos son de mucha utilidad ya que constituyen protocolos aplicables y adaptados a especies forestales que se pueden conservar y propagar masivamente.

**PALABRAS CLAVES:** Semillas sintéticas. encapsulado de embriones. germinación y almacenamiento.

## ABSTRACT

The technology of encapsulating embryos in sodium alginate (called synthetic or artificial seed) is a successful alternative for the propagation, multiplication and conservation of species. This study was developed in the In Vitro Plant Propagation Laboratory, Seed Laboratory, and greenhouse at the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cuenca, our main objective of evaluating the technique of encapsulation of zygotic embryos of two ecologically and socio-economically important species: *Vasconcellea cundinamarzensis* (chamburo) and *Hyeronima macrocarpa* (motilón) and their response in germination and conservation; for this, zygotic embryos were extracted from seeds in physiological maturity and deposited in 4% sodium alginate, one by one the embryos were deposited in a calcium chloride complexing agent in two concentrations of 50mM and 75mM and in two times of immersion 10 and 30 minutes in order to generate a cover that fulfills the function of nourish and protect to facilitate germination. After this, the effect of these variables on the viability of the encapsulated embryos was evaluated, at different storage times 0, 20 and 40 days in the germinating chamber and greenhouse environments. The highest germination values for *Vasconcellea cundinamarzensis* was the T4 treatment (4% alginate 75mM of CaCl<sub>2</sub> 30min) with 31.46%, while for *Hyeronima macrocarpa* in T4 (4% alginate 75mM of CaCl<sub>2</sub> 30min) 33.30%. Although there were no significant differences in the different treatments in this species. Synthetic seeds were stored for 0, 20, 40 days at 4 and 25 degrees Celsius and then brought to greenhouse and germinating chamber conditions for evaluation. Better germination was observed in greenhouse conditions than in germinating chamber conditions. Regarding the days of storage, *Vasconcellea cundinamarzensis* showed the germination percentage at (0 days) with 28, 38% when the embryo was encapsulated directly in the greenhouse, likewise for the species *Hyeronima macrocarpa* with a percentage of 51, 34%. Better development of seedlings from encapsulated embryos stored for 40 days at 25 °C and then planted in the greenhouse was obtained. The results obtained are very useful as they constitute protocols applicable and adapted to forest species that can be conserved and propagated massively.

**KEY WORDS:** Synthetic seeds. embryo encapsulation. germination and storage.



## ÍNDICES DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....</b>	<b>12</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>17</b>
<b>DEDICATORIAS .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
4.1. Semillas artificiales .....	22
4.2. Encapsulación .....	23
4.3. Materiales usados.....	23
4.3.1 Alginato de sodio .....	<b>23</b>
4.3.2. Cloruro de Calcio .....	<b>24</b>
4.4. Almacenamiento de semillas .....	24
4.5. Semillas recalcitrantes .....	25
4.6. Semillas ortodoxas .....	26
4.7. Germinación.....	26
4.8. Viabilidad.....	26
4.9. Vigor .....	26
4.10.2. <i>Hyeronima macrocarpa</i> (Motilón).....	28
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.1 Ubicación del área de estudio .....	30
5.2. Recolección y selección de semillas .....	30
5.3. Determinación del contenido de humedad de las semillas. ....	31
5.4. Pruebas de viabilidad .....	32
5.5. Objetivo 1. ....	33
5.5.1. Desinfección de semillas .....	33
5.5.2. Encapsulado .....	33
5.5.3. Germinación de semilla sintética. ....	34
5.5.4. Toma de datos .....	34



5.6. Objetivo 2. ....	35
5.7. Toma de datos. ....	36
5.8. Diseño experimental y análisis experimental .....	37
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
6.1. Evaluar las concentraciones de cloruro de calcio y tiempo de inmersión de embriones suspendidos en alginato de sodio y su respuesta en la germinación de las semillas sintéticas de las especies en estudio.....	38
6.2. Evaluar la viabilidad de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenamiento de 0, 20 y 40 días.....	40
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
8.1. Conclusiones.....	55
8.2. Recomendaciones.....	57
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Contenido de humedad inicial de las semillas <i>Hyeromina macrocarpa</i> y <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> .....	31
<b>Tabla 2.</b> Pruebas de viabilidad en semillas de <i>Hyeromina macrocarpa</i> y <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> . ....	32
<b>Tabla 3.</b> Descripción de los tratamientos que se utilizaron para el encapsulado.....	34
<b>Tabla 4.</b> Descripción de tiempo de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min para la especie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> y <i>Hyeromina macrocarpa</i> en los dos ambientes (cámara germinadora e invernadero).....	35
<b>Tabla 5.</b> Diferencia de medianas de los tratamientos de la especie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> en el ambiente invernadero aplicando la prueba de Kruskal Wallis..	39
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en diferentes tiempos de almacenados (0, 20 y 40 días). ....	42
<b>Tabla 7.</b> Diferencia de medianas según de la variable altura (cm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie <i>Hyeromina macrocarpa</i> en los 2 ambientes. ....	43
<b>Tabla 8.</b> Diferencia de medianas de la variable diámetro (mm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) de la especie <i>Hyeromina macrocarpa</i> en los 2 ambientes. ....	44
<b>Tabla 9.</b> Promedio de N° de hojas, Ancho y largo de las hojas (cm) con relación a los tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie <i>Hyeromina macrocarpa</i> en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).....	45



**Tabla 10.** Diferencia de medianas de la variable raíz (cm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes (cámara germinadora e invernadero).....45

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Zona de recolección de las semillas en estudio, en la provincia del Azuay y Cañar..... 30

**Figura 2.** Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de la especie *Vasconcellea cundinamarzensis* con relación a los tratamientos y controles en los ambientes (cámara germinadora e invernadero)..... 40

**Figura 3.** Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de la especie *Hyeronima macrocarpa* con relación a los tratamientos y controles en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) .....40

**Figura 4.** Porcentaje de germinación de los embriones encapsulados almacenados (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero)..... 42

**Figura 5.** Diagrama de puntos sobre la variable altura (cm) almacenamientos a (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).....44

**Figura 6.** Diagrama de puntos sobre la variable diámetro (mm) en los diferentes tiempos de almacenamiento (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes (cámara germinadora e invernadero)..... 45



**Figura 7.** Diagrama de puntos sobre la variable raíz (cm) en los diferentes tiempos de almacenamiento (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes cámara germinadora e invernadero.....47

**Figura 8.** Porcentaje de viabilidad de los embriones encapsulados almacenados (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).....48

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* en las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (50mM-75mM) y tiempos de inmersión (10 y 30 min).....63

**Anexo 2.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* en cuanto a concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  .....63

**Anexo 3.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* con relación al tiempo de inmersión en  $\text{CaCl}_2$ .....63

**Anexo 4.** Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas respecto al ambiente.....63

**Anexo 5.** Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a las especies en estudio..... 63





<b>Anexo 6.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> en el ambiente cámara germinadora. ....	64
<b>Anexo 7.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> en el ambiente invernadero.....	64
<b>Anexo 8.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> en el ambiente cámara germinadora e invernadero.....	64
<b>Anexo 9.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> en el ambiente cámara germinadora. ....	64
<b>Anexo 10.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> en el ambiente invernadero.....	64
<b>Anexo 11.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> en ambiente cámara germinadora. ....	65
<b>Anexo 12.</b> Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> en el ambiente invernadero.....	65
<b>Anexo 13.</b> Prueba de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) de las dos especies en estudio .....	65



<b>Anexo 14.</b> Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados con respecto al ambiente, días de almacenado y su temperatura. .....	65
<b>Anexo 15.</b> Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente      cámara germinadora de la especie <i>Hyeronina macrocarpa</i> ..	66
<b>Anexo 16.</b> Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie <i>Hyeronina macrocarpa</i> .	66
<b>Anexo 17.</b> Prueba de Kruskal Wallis para las variables: altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho-largo de la hoja y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en los 2 ambiente cámara germinadora e invernadero de la especie <i>Hyeronina macrocarpa</i> .....	67
<b>Anexo 18.</b> Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para los controles C1 y C2 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> .....	68
<b>Anexo 19.</b> Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para el C1 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> .....	69
<b>Anexo 20.</b> Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para el C2 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie <i>Hyeronima macrocarpa</i> .....	69



- Anexo 21.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables: altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho-largo de la hoja y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en los 2 ambiente cámara germinadora e invernadero de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*..... 70
- Anexo 22.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*... .. 70
- Anexo 23.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro.de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente cámara germinadora de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*..... 71
- Anexo 24.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*.....71
- Anexo 25.** Efecto de concentración (50-75mM) de  $\text{CaCl}_2$  y tiempo de inmersión (10-30min.) sobre el número total de semillas sintéticas germinadas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero)..... 72
- Anexo 26.** Número total de semillas sintéticas germinadas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en los dos ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenado (0,20 y 40 días) y su temperatura (4°C y 25°C)..... 72
- Anexo 27.** Efecto de concentración (50-75mM) de  $\text{CaCl}_2$  y tiempo de inmersión (10-30min.) sobre el número total de semillas sintéticas germinadas de *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero). .... 73



<b>Anexo 28.</b> Número total de semillas sintéticas germinadas de <i>Hyeronima macrocarpa</i> en los dos ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenado (0,20 y 40 días) y su temperatura (4°C y 25°C). ....	73
<b>Anexo 29.</b> Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> y <i>Hyeronima macrocarpa</i> en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenados (0,20 y 40 días). ....	75
<b>Anexo 30.</b> Fotografías de la Investigación. ....	76

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

CaCl<sub>2</sub>= Cloruro de Calcio

mM= miliMolar

Cámara Ger. = cámara germinadora

DCA= Diseño Completamente al Azar

Trat. = Tratamiento

T= Temperatura

M= media

Mdn= Mediana

DE= Desviación Estándar

min = minutos

cm= centímetros

mm= milímetros

Nro= número

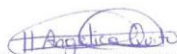
Cláusula de licencia y autorización para publicación en el  
Repositorio Institucional

---

Yo Angélica Noemí Quito Sinchi, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconocemos a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre de 2019



Angélica Noemí Quito Sinchi  
CI: 0106657695

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el  
Repositorio Institucional

---

Yo Ana Marlene Yunga Yunga, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconocemos a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de septiembre de 2019



Ana Marlene Yunga Yunga  
CI: 0105620207

### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo Angélica Noemí Quito Sinchi, autora del trabajo de titulación "Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de septiembre de 2019



Angélica Noemí Quito Sinchi  
CI: 0106657695

### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo Ana Marlene Yunga Yunga, autora del trabajo de titulación "Técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio para la germinación de: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, provincia Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de septiembre de 2019



Ana Marlene Yunga Yunga  
CI: 0105620207





## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios, por ser nuestro guía y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestras familias, quienes nos han brindado su apoyo incondicional durante toda nuestra etapa universitaria.

A nuestra directora de tesis Ing. Paulina Germania Villena Ochoa, MSc. por compartirnos sus conocimientos y brindarnos todo su apoyo incondicional para que se haga realidad este proyecto investigativo.

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al Dr. Eduardo José Chica, Blga. Denisse Peña y Blga. Fanny Ximena Palomeque Pesántez, PhD quienes nos asesoraron con sus conocimientos y nos brindaron su total apoyo.

Agradecemos a nuestros docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por formar parte de nuestro progreso de aprendizaje y formarnos como profesionales.

*Angélica Q. & Ana Y.*



## DEDICATORIAS

*Con todo mi amor y cariño dedico mi tesis a Dios quien es el único dueño de nuestra vida y destino, gracias a Él hoy estoy cumpliendo una de mis grandes metas.*

*A mis padres Remigio Quito y Norma Sinchi por su eterno amor, quienes a lo largo de su vida han velado por mi prosperidad y educación, siendo mi apoyo fundamental en cada instante, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba, sin dudar ni un solo momento en mi capacidad.*

*A mi hermana Jéssica por estar siempre a mi lado, apoyándome incondicionalmente para que yo cumpliera cada una de mis sueños.*

*A mis abuelos/as Manuel, Luzmila, Matilde, Alfonso, a mis tíos Carlos, Xavier, Freddy, Hernán y a mis primos Carlos David, Camila y Josselyn gracias por confiar siempre en mí y brindarme su apoyo incondicional.*

**Angélica Noemí Quito**

*Mi tesis la dedico primeramente a Dios quien siempre guía mi destino, y me ha permitido subir un escalón más en mi vida.*

*A mi madrina Esthela Vázquez quien es una mujer ejemplar a seguir, el pilar fundamental en mi vida, es la personita especial que me ha brindado todo su cariño, apoyo y confianza sin condición alguna, se ha preocupado por mi bienestar y educación, siempre ha formado parte de mis aventuras para que este sueño se haga realidad.*

*A mi madre Concepción quien confió cada momento en mí, me brinda su apoyo incondicional para que cumpliera uno de mis grandes logros.*

*A mis hermanas/os Gabriela, Lourdes, Karina, Rolando, Juan, Carlos y Claudio, quienes me apoyaron incomparablemente y hoy yo estoy cumpliendo mi meta, sin dejar atrás a mis sobrinos/as y amigos por ser cómplices de mis sueños.*

**Ana Marlene Yunga**



## 1. INTRODUCCIÓN

La dormancia y la germinación de las semillas son procesos fisiológicos determinantes en la reproducción exitosa de las plantas (Dürr et al., 2015). La germinación es la etapa inicial que comprende el desarrollo del embrión (Holl & Aide, 2011), mientras que la latencia es un período en el ciclo de vida de un organismo cuando el crecimiento y el desarrollo se detienen temporalmente, este proceso en la vida de la semilla se manifiesta con la reducción de la actividad metabólica, detención del crecimiento, desarrollo y actividad física de la semilla (Baskin & Baskin, 1998; 2004) constituyendo el principal mecanismo que controla el momento de la germinación (Baskin & Baskin, 2014). En muchas especies este mecanismo permite que las semillas retrasen la germinación hasta que las condiciones sean favorables para garantizar la supervivencia de las plántulas (Baskin & Baskin, 2004) y en otros casos bloquean la germinación impidiendo la producción de plántulas (Ferreira, 2014).

Las semillas de muchas especies arbóreas poseen un determinado tipo de latencia, Baskin & Baskin (1998; 2004), distingue cinco clases de latencia: (1) latencia fisiológica (PDD), (2) latencia morfológica (MD), (3) latencia morfofisiológica (MPD), (4) latencia física (PY), y (5) una latencia combinada (PD), y a veces la misma semilla pueden manifestar más de un tipo, dependiendo de las características propias de cada especie. La clasificación más sencilla distingue tres tipos de latencia (1) latencia exógena o del pericarpo/cubierta seminal; y (2) latencia endógena o embrión y (3) latencia combinada sin embargo la latencia física que es muy frecuente en especies de trópicos secos y ocurre en algunas o todas las especies de las familias de plantas angiospermas y podría bloquear la germinación debido en gran parte a que presentan una o más capas impermeables al agua o gases (Venier et al., 2012; Baskin & Baskin, 2004; 2014), en este caso se precisa algún tipo de tratamiento previo para una germinación rápida y uniforme.



Como alternativa para la propagación de especies cuyas semillas presentan latencia física y presentan cubiertas o pericarpos duros, es el uso de la tecnología de semillas artificiales o semillas sintéticas, que consiste en la encapsulación de embriones cigóticos en gel de alginato simulando un endospermo artificial que cumple la función de nutrirlo y protegerlo facilitando la germinación, y representa una opción viable para la propagación a gran escala de especies silvestres, amenazadas o en vías de extinción, híbridos exclusivos, genotipos superiores y genotipos estériles inestables que en condiciones naturales enfrentan dificultades (Nigar, 2013). Sin embargo, la tecnología de encapsulamiento de embriones requiere que la composición de la matriz protectora (endospermo artificial) permita el crecimiento del embrión, proporcionando resistencia mecánica de acuerdo con la energía disponible del embrión propio de cada especie, un endospermo artificial excesivamente duro produce pérdida de energía y un crecimiento débil o muerte del embrión o explante por lo tanto, estudios dirigidos a evaluar la aplicabilidad de esta técnica son necesarios (Jiménez & Quiala, 1998; González et al., 2004).

Los materiales usados en la producción de semillas sintéticas desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la técnica, el alginato de sodio es un hidrogel seleccionado como componente de la matriz de encapsulación de semillas sintéticas, la dureza de la cápsula puede variar con la concentración de alginato y la concentración de la solución de cloruro de calcio, por tanto el material de encapsulación y su consistencia influyen de manera importante sobre el tiempo de germinación y la conservación de las semillas sintéticas (Gantait, 2015), un endospermo duro podría perjudicar el desarrollo del embrión y afectar su viabilidad (González et al., 2004). En torno a esto, la presente investigación evaluó el alginato de sodio al 4% sobre la concentración y tiempo de exposición en complejo de cloruro de calcio, y su respuesta en la germinación de los embriones encapsulados y posterior supervivencia de las plántulas.



Varios autores afirman que las semillas sintéticas son una alternativa para romper barreras en la germinación, como la dormancia física y/o morfológica permitiendo de esta manera la propagación de plantas. Con relación a las especies de nuestro estudio *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*, las semillas presentan una germinación errática y tardía determinada por una latencia física y de carácter endógeno (Morales & Cano, 2012).

Se han reportado casos exitosos de producción de semillas sintéticas y regeneración de plántulas para: mora (*Rubus ulmifolius*) (Pattnaik, 2000); mango (*Mangifera indica*), piña (*Ananas comosus*), manzana (*Pyrus malus* L.), guayaba (*Psidium guajava*), papaya (Gantait et al., 2015; Rai et al., 2009); arroz (*Oryza sativa*) (Rani, 2002); paulownia (Ipeczi, 2003); cítricos (Germana, 2007); Roble (Cortes, 2009); herbáceas (Moquammel, 2015); ornamentales (Yucesan B, 2014); palma (*Elaeis guineensis*) (Palanyandy, 2014) y otros, sin embargo, no se han encontrado estudios que aplique esta técnica de encapsulados en especies como: *Vasconcellea cundinamarcensis*, (chamburo), ni en *Hyeronima macrocarpa* (motilón). Por otro lado, en la mayoría de los casos, se han reportado protocolos de encapsulación en embriones somáticos; sin embargo, pocos estudios han reportado la encapsulación de embriones cigóticos (Cortes, 2009). En este estudio se aplicó la tecnología de encapsulamiento a embriones cigóticos extraídos de semillas de las dos especies antes mencionadas.

Finalmente, los periodos de almacenamiento cumplen un rol importante en el comportamiento de los embriones encapsulados; se ha reportado que el almacenamiento prolongado disminuye la tasa de germinación probablemente a causa de la escasez de oxígeno para el embrión (Redenbaugh et al., 1991). Según Barbotin (1993), afirma que la germinación rápida de las semillas sintéticas, depende en particular de la fisiología de los



embriones y células inmovilizados. De manera que también se evaluó el comportamiento de los embriones durante diferentes periodos de almacenamiento.

## OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la técnica de encapsulamiento de embriones en alginato de sodio como estrategia para la germinación y conservación de dos especies: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*.

### 2.2. Objetivos específicos

Evaluar las concentraciones de cloruro de calcio y tiempo de inmersión de embriones suspendidos en alginato de sodio y su respuesta en la germinación de las semillas sintéticas de las especies en estudio.

Evaluar la viabilidad de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenamiento de 0, 20 y 40 días.

## 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el efecto del tiempo de inmersión en complejo de cloruro de calcio de embriones suspendidos en alginato de sodio al 4% en la germinación de semillas sintética de *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*?

¿Hay diferencias en la viabilidad de los embriones encapsulados en los diferentes periodos de almacenamiento (0, 20 y 40 días)?

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Semillas artificiales



Los autores (Jakob Reinert & Steward, 1958) manifiestan sobre el inicio de producir semillas artificiales en diferentes especies, sin embargo, quien realizó varios estudios sobre mejoramientos a la técnica fue Toshio Murashige, quien 1977 dio a conocer su idea de un embrión somático encapsulado, la presencia de un embrión somático, no cigótico y una cubierta y endospermo hechos de un medio sintético son las principales características una semilla artificial, esto permite que la semilla germine en condiciones adecuadas (Levitus, 2010).

El desarrollo de semillas artificiales tiene como objetivo producir plantas genéticas y morfológicamente iguales (clones) a la especie de la que derivan, ya que su gran interés es conservar plantas que sean capaces de superar limitaciones de adaptación tanto al clima como a cualquier otro factor externo limitante como puede ser en la nutrición, plagas o enfermedades (Levitus, 2010).

## **4.2. Encapsulación**

La encapsulación es una técnica que se utiliza para mejorar la supervivencia de embriones o partes vegetativas; el objetivo de encapsulado es de generar una cubierta protectora que cumpla la función de nutrir y proteger al embrión para facilitar su posterior germinación (Hinestroza Cordoba & Lopez Malo, 2008).

## **4.3. Materiales usados**

Los materiales usados en la producción de semillas sintéticas desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la técnica y son los siguientes:

### **4.3.1 Alginato de sodio**

El alginato está compuesto por una mezcla de ácidos poliurónicos y ácido b-manurónico. El principio del encapsulamiento de los embriones es la reacción del sodio presente en el alginato con la solución de cloruro de calcio di hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), consistiendo en un



intercambio iónico, estas reacciones dan como finalidad la formación de esferas sólidas que contienen a los embriones, y a su vez da nutrientes al embrión, la incorporación de reguladores de crecimiento y la adición de nutrientes a la matriz del encapsulado. Sin embargo, los embriones que obtienen estos elementos pueden ser conservados por largos periodos de tiempo sin perder su viabilidad (Onishi et al., 1994).

Según (Onishi et al., 1994), revela que el alginato de sodio ayuda para el encapsulado, debido a sus características, como viscosidad moderada, baja toxicidad y rápida gelificación y según los autores (Patel et al., 2000; Maruyama et al., 2003; Utomo et al., 2008), nos indican que para encapsular embriones somáticos utilizaron concentraciones de alginato de sodio con complejo de cloruro de calcio, obteniendo los mejores resultados de germinación y crecimiento de plántulas.

La dureza de la cápsula puede variar con la concentración de alginato y la concentración de la solución de cloruro de calcio, por tanto, el material de encapsulación y su consistencia influyen de manera importante sobre el tiempo de germinación y la conservación de las semillas sintéticas (Gantait, 2015). Un endospermo duro podría perjudicar el desarrollo del embrión y afectar su viabilidad (González et al., 2004).

#### **4.3.2. Cloruro de Calcio**

Según los autores (Hinestroza Cordoba & Lopez Malo, 2008), se usa el cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ), porque tiene una gran capacidad de propiciar la esferificación, permitiendo una gelificación casi inmediata.

#### **4.4. Almacenamiento de semillas**

El buen almacenamiento de semilla tiene como propósito de conservar el potencial de germinación o su viabilidad a un largo periodo (Humanante, 2005).





Los periodos de almacenamiento desempeñan un rol importante en el comportamiento de los embriones encapsulados; se ha reportado que el almacenamiento extenso disminuye la tasa de germinación probablemente a causa de la escasez de oxígeno para el embrión. Redenbaugh et al., (1991), por el contrario, Janeiro et al., (1995), observaron un incremento en la tasa de germinación en embriones almacenados por dos meses comparados a los almacenados por un mes, afirma que la germinación rápida de las semillas sintéticas, depende en particular de la fisiología de los embriones y células inmovilizados (Barbotin, 1993).

Según el potencial de almacenamiento de las semillas se clasifica en dos categorías que son semillas recalcitrantes y ortodoxas (Schmidt, 2000).

#### **4.5. Semillas recalcitrantes**

Las semillas recalcitrantes son aquellas semillas que no sobreviven ciertas condiciones como sequias, bajas temperaturas menores de 10 °C, además el contenido de humedad relativa es bajo, su vida posterior a la cosecha es muy corta, ya sea meses o días, dependiendo de la especie (Gentil, 2001).

Las semillas recalcitrantes son muy delicadas a la desecación en la cual pierde su viabilidad si su contenido de humedad es mínimo de 20-30%, (Pritchard, 2004), por otro lado, (Gentil, 2001), demuestra que estas semillas pueden tolerar la deshidratación entre 15 y 50% de humedad.

Se ha verificado que semillas frescas con un contenido de 40% humedad fueron almacenadas durante seis meses a temperaturas de 5, 15 y 25 °C, los resultados revelaron que las semillas almacenadas a temperatura de 5°C pierden su capacidad de germinación después de un mes. Además, la capacidad de germinación de estas semillas se mantuvo a dos meses a una temperatura de 15 °C, disminuyendo desde el 98% al inicio a 10% después de tres meses. Las semillas almacenadas a temperatura ambiente de 25°C, su viabilidad se disminuyó a



menos del 20% de germinación después de solo un mes y la germinación no se produjo después de este período (Diallo, Wade , Sarr , & Gaye, 2000).

#### **4.6. Semillas ortodoxas**

Las semillas ortodoxas son aquellas semillas las cuales podemos conservar por un largo periodo de tiempo, poseen un alto vigor y viabilidad, además sobreviven a los periodos de desecación (Roberts, 1973).

#### **4.7. Germinación**

Según Moreno (1996), define a la germinación de una semilla como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras fundamentales que arrancan del embrión y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una nueva plántula.

La germinación de la semilla puede ser inmediata, pero generalmente hay un retraso, ya sea como resultado de la inactividad, o latencia, que puede ser tanto físico como fisiológico (Fenner & Thompson, 2006), las semillas germinarán pronto si las condiciones son propicias para la germinación, mientras que las semillas latentes impiden la germinación cuando las condiciones son favorables, pero la probabilidad de supervivencia y crecimiento de las plántulas es bajo (Finch Savage & Leubner-Metzger, 2006).

#### **4.8. Viabilidad**

La viabilidad de una semilla hace referencia a su capacidad de germinar y de originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables; para evaluar y cuantificar la viabilidad de una semilla se puede realizar mediante un test del tetrazolio (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) (Pérez García & Pita Villamil, 2014).

#### **4.9. Vigor**



El vigor de las semillas se establece como el conjunto de propiedades que evalúa el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante su periodo de germinación, si las semillas presentan un buen comportamiento podemos decir que son semillas de alto vigor (Pérez García & Pita Villamil, 2014).

#### **4.10. Descripción de las especies en estudio**

##### **4.10.1. *Vasconcellea cundinamarcensis* (Chamburo)**

De acuerdo con Quintanilla (1995), esta especie se encuentra desde Colombia hasta Bolivia en forma espontánea; por esto es de gran importancia cuidar el germoplasma de esta especie.

En la Región Andina cada vez existe mayor interés investigativo en la familia Caricaceae, en particular del género *Vasconcellea*, debido a su potencial como frutal exótico con gran variabilidad genética. *Vasconcellea cundinamarcensis* es una especie consumida tradicionalmente en los Andes Ecuatorianos. La región austral del Ecuador es uno de los pocos lugares del mundo donde se pueden encontrar variedades casi extintas de este género, debido a las especiales condiciones climáticas que presenta (Soto, 2016); la amenaza de esta especie se observa con mayor impacto en la destrucción de los hábitats donde éstas se encuentran, como secuela de la deforestación y reconversión de los bosques a tierras de cultivo o pastizales (IUCN, 2003).

Esta especie se propaga ocasionalmente por semillas, pues presentan una germinación errática y tardía, determinada por una latencia de carácter endógeno (Torres, 2006), se indica además que las *Caricaceas* en general presenta una latencia combinada, promovida por la testa semipermeable y compuestos fenólicos que la integran (Tokuhisa et al., 2007). Es por esta razón que para obtener plantas de calidad desde semillas se necesita de inductores germinativos, los cuales servirán para acelerar el proceso de germinación. De acuerdo con las



normas internacionales de la ISTA (Asociación Internacional de Análisis de Semillas) (2007), la germinación es la emergencia y desarrollo a partir del embrión de todas aquellas estructuras esenciales de cualquier tipo de especie.

Según Cadavid et al. (2003), *Vasconcellea cundinamarcensis* no han encontrado importancia como cultivo en toda la región andina y se las localiza como plantas individuales; sin embargo, en Chile, esta especie, se la conoce como parpayuela o papayo de montaña, es un cultivo de exportación, con un área de siembra alrededor de 225 hectáreas, cuya producción sirve para la industria para preparar conservas, jugos y mermeladas (Carrasco et. al., 2009).

Por lo anteriormente descrito, se ve la necesidad de propagar plantas de esta especie de forma rápida y segura, ya que en Ecuador se encuentran especies que no hay en otras regiones andinas, sería interesante poder comenzar una producción de estas especies y además los agricultores tendrían un gran ingreso económico, con especies que son absolutamente “nuestras” sin dejar de ser rentables.

Para esta especie *Vasconcellea cundinamarcensis* no hay mucha información acerca de tratamientos pre-germinativos de las semillas, pero se pueden emplear métodos que ya fueron utilizados en especies de la misma familia Caricaceae. Según Flores, et al. (2008), los frutos utilizados con fines de propagación deben ser de color amarillo, blandos al tacto y olor agradable (Zúñiga, 2006).

#### **4.10.2. *Hyeronima macrocarpa* (Motilón)**

Es una especie de corteza agrietada y grisácea, que alcanza a una altura de 15 a 20 m., su tronco es casi cilíndrico y un tanto rugoso. Además, su copa es amplia con ramificación densa, su madera es rojiza y es de gran durabilidad (Vargas, 2002).



En nuestro país, esta especie ha sido localizada entre 1500 a 3500 m.s.n.m en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Bolívar, Cañar y Napo. Presentan un mejor desarrollo desde los 2900 a los 3200 m.s.n.m. (Prado, L., et al. 2000).

La mayor presencia de frutos se observa en los meses de febrero a mayo en las partes más bajas y en junio a octubre en zonas de mayor altitud.

El fruto del motilón es una drupa carnosa, piriforme, negra con pulpa morada, el fruto contiene solamente una semilla pequeña de forma globosa, color café oscuro con testa dura. El embrión es grande en relación con el tamaño de la semilla (Müeller, 2003).

Según estudios realizados manifiestan que un kilogramo de semillas contiene aproximadamente 15000 semillas viables con un porcentaje de germinación de 40 a 50% (Vargas, 2002).

Esta especie favorece significativamente con el aporte de nutrientes, conserva la humedad y además de ello brinda refugio y alimento a la biodiversidad a pesar de todas sus bondades es <sup>una</sup> más de las especies forestales que se encuentran en peligro de extinción en nuestro país (MAE, 2011).

Sobre el poder germinativo de esta especie su información es muy escasa, sin embargo, han realizado estudios que las semillas almacenadas durante un año solo pueden germinar el 65% aproximadamente, sin embargo, la germinación de esta especie tarda de 40-60 días, aunque puede extenderse hasta por 200 días (Müller, 1997).

El fruto de la *Hyeronima macrocarpa* es una drupa carnosa de color morada, posee una semilla con testa dura de forma elipsoide que puede medir hasta 2 cm de longitud (Mueller, J. 2003).

Según Vargas, W. (2002) indica que un kilogramo de semillas contiene más o menos 15000 semillas viables con un porcentaje de germinación de 40 a 50%.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

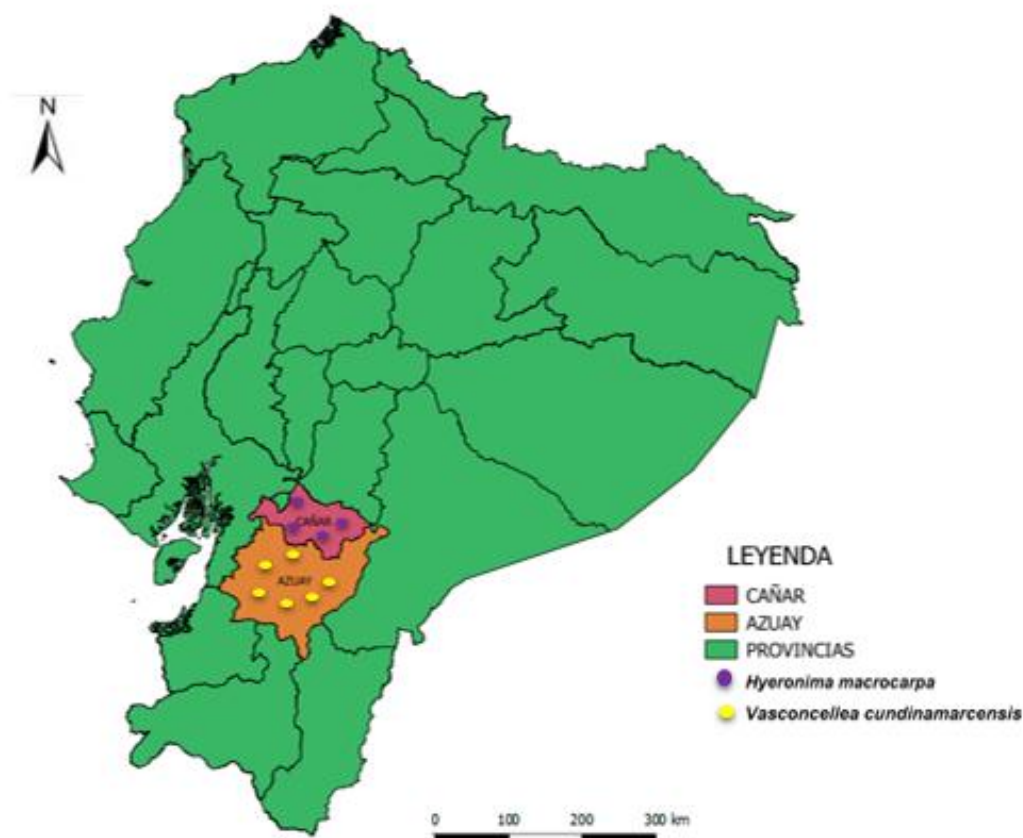
### 5.1 Ubicación del área de estudio

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Propagación In Vitro de Plantas, Laboratorio de Semillas y en un invernadero de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada a 2590 m.s.n.m. con una temperatura de 18 - 30°C y una precipitación de 878 mm.

### 5.2. Recolección y selección de semillas

Las semillas de *Hyeronima macrocarpa* fueron recolectadas en la provincia de Cañar, y las semillas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en la provincia del Azuay (Figura 1), para cada especie se eligió (8 árboles), en cada árbol se cotejaron características fenotípicas superiores como: madurez fisiológica del fruto, buen desarrollo de la copa del árbol, fuste recto y altura. Se seleccionaron frutos: en buen desarrollo, mejor tamaño, sin plagas ni enfermedades y frutos que se encontraban en el árbol en su última fase de maduración, para poder extraer el embrión de la semilla.

### ZONA DE RECOLECCIÓN DE LAS SEMILLAS EN ESTUDIO



**Figura 1.** Zona de recolección de las semillas en estudio, en la provincia del Azuay y Cañar.

### 5.3. Determinación del contenido de humedad de las semillas.

Las semillas colectadas de cada árbol fueron mezcladas para constituir el lote de semillas, del lote de semillas se seleccionó una muestra de 50 semillas por cada especie para analizar el contenido de humedad inicial

El cálculo del contenido de humedad, se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

Dónde:

$$(m2 - m3) \frac{100}{m2 - m1}$$

**m1:** peso en gramos del contenedor y su cubierta

**m2:** peso en gramos del contenedor, su cubierta y las semillas antes del secado.

**m3:** peso en gramos del contenedor, su cubierta y las semillas después del secado.



Las muestras de semillas fueron secadas en una estufa por 17 horas a 103°C y sus resultados se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1**

Contenido de humedad inicial de las semillas *Hyeromina macrocarpa* y *Vasconcellea cundina marcensis*.

Especies	Contenido de Humedad	Contenido de Humedad %
<i>Hyeromina macrocarpa</i>	Inicial	Con testa= 72,82 % Sin testa = 53,06%
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	Inicial	Con testa = 34,17% Sin testa = 41,53%

#### 5.4. Pruebas de viabilidad

La prueba de viabilidad fue realizada usando el método estandarizado de tinción con sal de tetrazolio (TZ), para ello 20 semillas por cada especie fueron seleccionadas, de cada semilla se rescató su embrión sin causar daño a los cotiledones y estos embriones fueron sumergidos en una solución de tetrazolio (C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>) al 1%, se incubó por 2 horas en estufa a 40°C y se procedió a la lectura de sus resultados (Tabla 2). Los resultados fueron evaluados considerando la diferencia de los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Las semillas al ser hidratadas la actividad de las deshidrogenasas incrementan resultando en la liberación de iones hidrógeno tiñendo los tejidos vivos de color rojo en tanto que los tejidos muertos permanecen sin colorear. Un embrión viable tendrá la capacidad de germinar y producir una plántula normal.

**Tabla 2**

Pruebas de viabilidad en semillas de *Hyeromina macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis*.

Especies	# de semillas	Embriones teñidos	Porcentaje de Viabilidad
<i>Hyeromina macrocarpa</i>	20	13	65 %
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	20	12	60 %





## 5.5. Objetivo 1.

**Evaluar las concentraciones de cloruro de calcio y tiempo de inmersión de embriones suspendidos en alginato de sodio y su respuesta en la germinación de las semillas sintéticas de las especies en estudio.**

Para cumplir con este objetivo se realizaron las siguientes actividades

### 5.5.1. Desinfección de semillas

Las semillas de las dos especies fueron lavadas en agua corriente por 2 minutos, luego fueron sometidas a cloro comercial 5% por 5 minutos. Para la especie *Hyeronima macrocarpa* (motilón), las testas duras fueron destruidos con la ayuda de un martillo, los cotiledones se extrajeron con mucho cuidado y se desinfecto nuevamente en cloro al 3% por 3 minutos, transcurrido este tiempo se lavó 3 veces con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo, en condiciones asépticas, seguido a ello se extrajeron los embriones y finalmente fueron encapsulados.

Para la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* (Chamburo), las semillas fueron desinfectadas con cloro al 3% durante 2 minutos, dentro de la cámara de flujo procedimos a lavarlo 3 veces con agua estéril en condiciones asépticas, seguido a ello se extrajeron los embriones y luego se encapsularon.

### 5.5.2. Encapsulado

Para la encapsulación de los embriones se preparó una matriz de alginato de sodio (4% p/v), se depositó uno a uno en complejo con cloruro de calcio (50 y 75mM), enriquecida con sales MS y se esperó durante 10 y 30 minutos para que se forme la perla, a continuación, cada encapsulado fue recuperada por decantación del  $\text{CaCl}_2$  y lavados 3 veces con agua estéril (Tabla 3).

Las semillas sintéticas se colocaron en tubos de ensayo estériles y luego fueron almacenados a diferentes temperaturas (4 y 25 °C) durante los periodos de tiempo (0, 20, 40 días).

**Tabla 3**

Descripción de los tratamientos que se utilizaron para el encapsulado

Tratamientos	Alginato de sodio	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	Tiempo
	%	mM	Min
T1	4	50	10
T2	4	50	30
T3	4	75	10
T4	4	75	30

T1: alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 50 mM por 10 min; T2: alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 50 mM por 30 min; T3: alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 75 mM por 10 min; T4 alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 75mM por 30 min.

### 5.5.3. Germinación de semilla sintética.

Una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento (0, 20 y 40 días), las semillas sintéticas fueron llevadas a germinación en bandejas germinadoras en condiciones de laboratorio  $\pm$  25 °C, 16 horas luz y 8 horas oscuridad) y en condiciones de invernadero a una temperatura  $\pm$  18 - 25 °C para su evaluación.

El criterio para considerar una semilla sintética germinada correspondió a la observación de desarrollo de la radícula y emisión de los dos primordios foliares.

### 5.5.4. Toma de datos

La toma de datos se realizó cada 2 días dentro de un período de 30 días, considerados a partir de la primera semilla sintética germinada. El porcentaje de germinación de semillas fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de semillas germinadas} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ Total, de semillas}}$$



## 5.6. Objetivo 2.

**Evaluar la viabilidad de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenamiento de 0, 20 y 40 días.**

Después de obtener semillas sintéticas de cada especie, se almacenaron en tubos de ensayo a temperatura de 4 °C y 25 °C durante los periodos de (0, 20, 40 días), el experimento constituyó de 4 tratamientos con 3 repeticiones, cada tratamiento estaba formado de 25 embriones encapsulados, los cuales se dividieron en 4 subunidades, cada subunidad contenían de 5 embriones encapsulados de la cual se clasificaron de la siguiente manera: 5 encapsulados almacenados por 0 días, 5 encapsulados almacenado por 20 días a 4°C, 5 encapsulados almacenados por 20 días a 25°C, 5 encapsulados almacenados por 40 días a 4°C y 5 encapsulados almacenados por 40 días a 25°C Transcurrido el tiempo de almacenamiento, las semillas sintéticas fueron transferidas a bandeja s germinadoras, estas bandejas contenían turba estéril y luego fueron llevadas a 2 ambientes diferentes, el primero fue en cámara germinadora a una temperatura de 25°C, 16 horas luz y 8 horas oscuridad, y el segundo fue en invernadero a una temperatura  $\pm 18-25$  °C, para su respectivo desarrollo y evaluación (Tabla 4).

**Tabla 4**

Descripción de tiempo de almacenado (0, 20 y 40 días) para la especie *Vasconcellea cundinamarzensis* y *Hyeronima macrocarpa* en los dos ambientes (cámara germinadora e invernadero)

Ambiente	Tratamientos	Almacenamiento (días)/Temperatura (°C)					
Cámara germinadora	T1	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T2	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T3	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T4	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
Invernadero	T1	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T2	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T3	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			
	T4	0 días	20 días	40 días			
			4°C 25°C	4°C 25°C			

### 5.7. Toma de datos.

Con respecto a la toma de datos se eligió al azar las plántulas de las 2 especies en estudio, para realizar su respectivo análisis.

En cuanto a las variables a medirse, se calculó el porcentaje de viabilidad de las semillas sintéticas almacenadas a los 0, 20 y 40 días (número de embriones con emisión de la radícula), además se calculó el número de plántulas normales (% de emergencia). Transcurrido 30 días, cada plántula normal fue considerada para el análisis de altura (cm), diámetro del tallo (mm), número de hojas, ancho y largo de la hoja(cm), longitud de la raíz (cm), para esta última variable se seleccionó 1 plántula al azar por cada repetición al finalizar el experimento.

La toma de datos se realizó cada 2 días en un período de 30 días, considerando a partir de la primera germinación.

### 5.8. Diseño experimental y análisis experimental

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial más dos testigos o controles ( $2 \times 2 + 2$ ), con tres repeticiones. Para realizar el experimento se utilizó 660 semillas por cada especie en estudio, con un total de 600 encapsulados y las 60 semillas se utilizaron para los controles.

Algunas variables no presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo cual se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis. Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico InfoStat 2018 y (R Studio).



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis general de los datos

Mediante el análisis aplicado se obtuvo diferentes respuestas del encapsulado de embriones en las especies *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa* y se explican a continuación de acuerdo a cada objetivo propuesto:

### 6.2. Evaluar las concentraciones de cloruro de calcio y tiempo de inmersión de embriones suspendidos en alginato de sodio y su respuesta en la germinación de las semillas sintéticas de las especies en estudio.

Al evaluar las concentraciones de cloruro de calcio y tiempo de inmersión de los embriones suspendidos en alginato de sodio al 4% se evidenció mediante la prueba de Shapiro-Wilks en donde, muestra que el efecto de concentración de  $\text{CaCl}_2$  de (50mM y 75mM) en alginato de sodio (4 %) en los tiempos de inmersión de (10 y 30 min.) los datos no se distribuyeron de forma normal ( $p < .05$ ) para el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* (Anexo 1), por lo que se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, en donde, la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas no fueron significativos entre ellas ( $K(120) = 0.47$ ,  $p = 0.4476$  (Anexo 2); sin embargo, con relación a los tiempos de inmersión de 10 y 30min. si existió diferencia significativa  $K(120) = 7.81$ ,  $p = 0.0021$  para las 2 especies en estudio (Anexo 3).

Al considerar el factor ambiente y su respuesta a la germinación, la prueba de Mann Whitney, tanto en (cámara germinadora ( $M=12.43$ ,  $DE=19.12$ ) e invernadero ( $M=24.43$ ,  $DE=24.35$ ) mostraron diferencias significativas  $K(120)$ ,  $p = 0.0001$  (Anexo 4), en las dos especies: *Hyeronima macrocarpa* ( $M=23.33$ ,  $DE=24.34$ ) y *Vasconcellea cundinamarcensis* ( $M=13.52$ ,  $DE=19.75$ )  $K(120)$ ,  $p=0.0011$  (Anexo 5).

Para la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente cámara germinadora, la prueba de Kruskal Wallis mostró que no existe diferencias significativas entre los tratamientos para el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas K (15) =6.56, p= 0.079 (Anexo 6), pero en el ambiente invernadero si hubo diferencia significativa entre tratamientos K (15) =7.38, p= 0.0395 (Anexo 7).

En la (Tabla 5), se observa la diferencia de los tratamientos T4 (Mdn=39.23) y T2 (Mdn=39.23) son significativamente diferentes al T3 (Mdn=26.57) y T1 (Mdn=0.00), es decir, que el tratamiento con mayor porcentaje de germinación fue el T4 (4% de alginato+75mM de CaCl<sub>2</sub>+30min.), seguido del T2 (4% de alginato+50 mM de CaCl<sub>2</sub>+30min), mostrando un efecto positivo en la germinación. Los controles C1 (sin testa) y C2 (con testa) de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* no muestra diferencia significativa debido a que no presentaron germinación en los ambientes cámara germinadora e invernadero (Anexo 8).

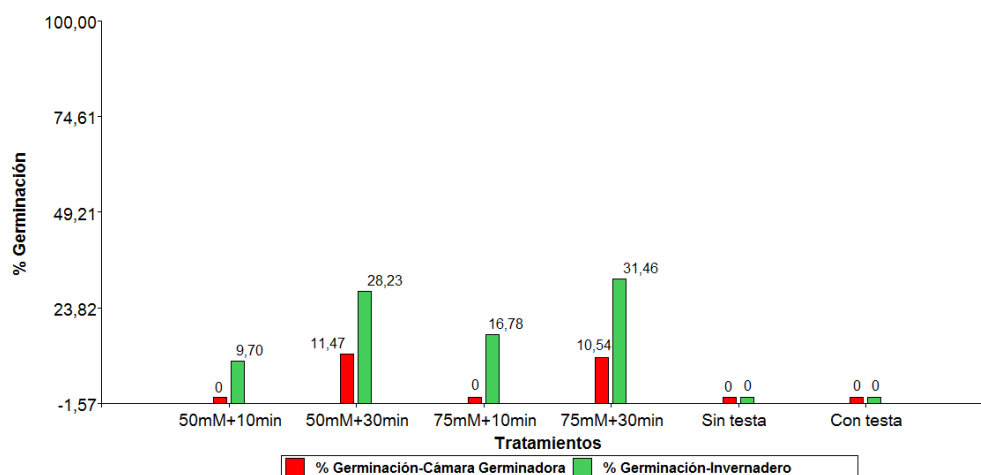
**Tabla 5**

La prueba de Kruskal Wallis muestra la diferencia de medianas de los tratamientos de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente invernadero.

Tratamientos	Medianas	Rangos	
T4 (4%+75mM+30min.)	39,23	42,07	A
T2 (4%+50mM+30min.)	39,23	40,07	A
T3 (4%+75mM+10min.)	26,57	32,27	B
T1 (4%+50mM+10min.)	0,00	26,00	B

En la Figura 2, se observa el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en los dos ambientes, el tratamiento con mayor porcentaje de germinación en el ambiente invernadero fue el T4=31,46% y el que presentó menor germinación fue el T1=9,70% mientras que para el ambiente cámara germinadora en el T4 se registró un 10,54% los controles C1 y C2 no germinaron.

### Germinación de embriones encapsulados de *Vasconcellea cudinamarcensis*



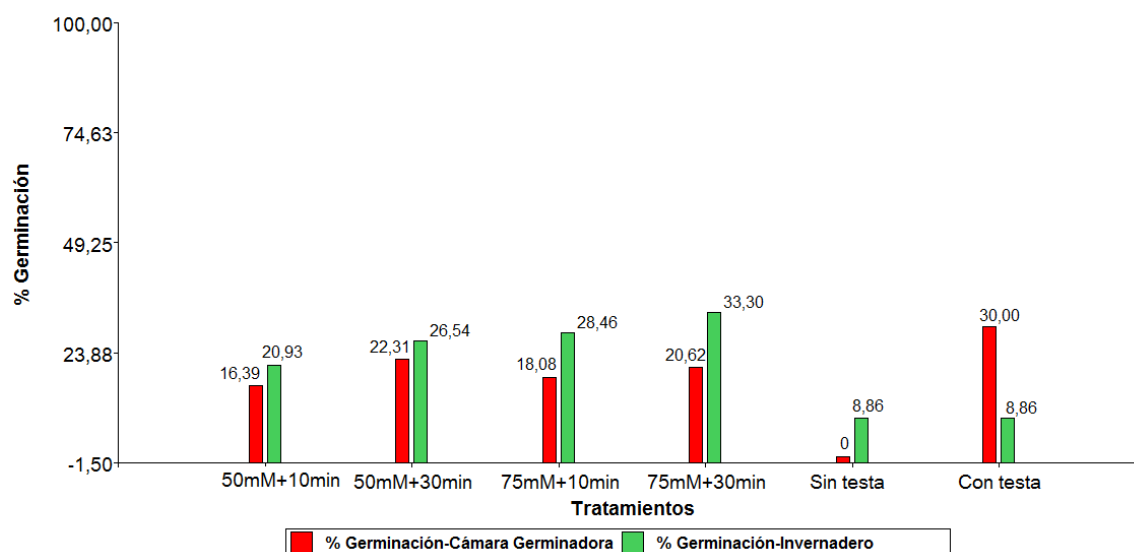
**Figura 2.** Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de la especie *Vasconcellea cudinamarcensis* con relación a los tratamientos y controles en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).

En la especie *Hyeronima macrocarpa* mediante la prueba de Kruskal Wallis no existió diferencia significativa entre tratamientos para el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas en los dos ambientes: cámara germinadora  $K(15) = 2.86$ ,  $p = 0.6317$  (Anexo 9) e invernadero  $K(15) = 4.32$ ,  $p = 0.448$  (Anexo 10), debido a que todos los tratamientos son equivalentes de acuerdo al porcentaje de germinación en los dos ambientes (Figura 3).

Con relación a los controles C1 (sin testa) y C2 (con testa), los resultados de porcentaje de germinación no fueron significativos entre los ambientes, cámara germinadora  $K(3) = 1.71$ ,  $p = 0.4000$  (Anexo 11), y en el invernadero  $K(3) = 0.00$ ,  $p > 0.9999$  (Anexo 12).



### Germinación de embriones encapsulados de *Hyeronima macrocarpa*



**Figura 3.** Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de la especie *Hyeronima macrocarpa* con relación a los tratamientos y controles en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).

### 6.3. Evaluar la viabilidad de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenamiento de 0, 20 y 40 días.

La prueba de Shapiro-Wilks indica que para las dos especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* al utilizar las concentraciones de 50mM y 75Mm de  $\text{CaCl}_2$  por 30min, en los tiempos de almacenamiento de 0, 20 y 40 días no existió normalidad en los datos ( $p < .05$ ) sobre el porcentaje de germinación de los embriones encapsulados (Anexo 13). Sin embargo, con la prueba de Kruskal Wallis el porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en diferentes tiempos de almacenados mostraron diferencias significativas entre ellos, los diferentes periodos de almacenado a los 0 días ( $\text{Mdn}=26.57$ ), 20 días ( $\text{Mdn}=0.00$ ) y 40 días ( $\text{Mdn}=0.00$ ),  $K(48) = 14$ ,  $p = 0.0002$  en las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* (Tabla 6).

**Tabla 6**

Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en diferentes tiempos de almacenados (0, 20 y 40 días) en las concentraciones de 50-75mM CaCl<sub>2</sub> por 30min en las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis*.

Variable	Almacenado	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	P
% Germinación	0 días	48	29,93	11,86	26,57	153,84	14	0,0002
% Germinación	20 días	48	15,92	20,94	0,00	114,17		
% Germinación	40 días	48	15,18	22,92	0,00	110,16		

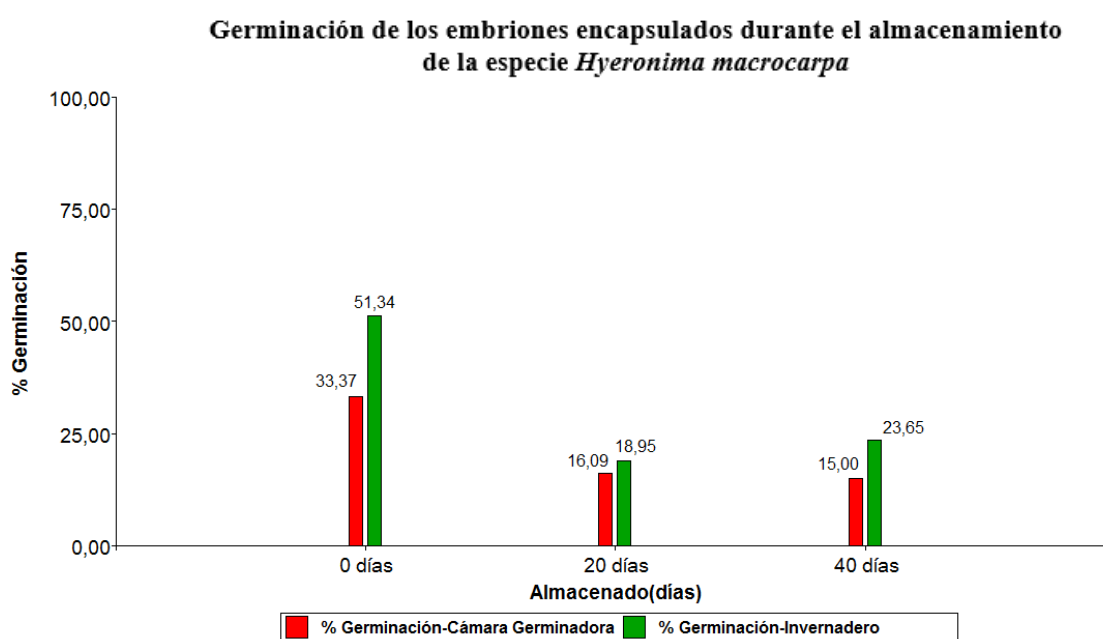
Se analizó el desarrollo inicial de las semillas sintéticas viables en la cámara germinadora e invernadero y, se comparó con la temperatura de almacenamiento (4 y 25°C), sus resultados mostraron que la temperatura de almacenado fue el factor determinante sobre el porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en las dos especies, por tanto si existe diferencias significativas entre ellas K (24), p= 0.0042 de acuerdo con los días de almacenamiento (0, 20 y 40 días) en las dos especies en estudio (Anexo 14).

Los embriones encapsulados no mostraron germinación cuando fueron almacenados a una temperatura de 4°C y almacenados por 20 y 40 días en las 2 especies, mientras que los embriones encapsulados y almacenados por 20 y 40 días a una temperatura de 25 °C, presentó germinación en las dos especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis*.

### 6.3.1. Resultados de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) y diferentes tiempos de almacenamiento.

La especie *Hyeronima macrocarpa* en ambiente invernadero al utilizar las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min presentaron un buen porcentaje de germinación, cuando los embriones encapsulados fueron sembrados directamente sin ser almacenados (0 días), obteniendo un porcentaje de germinación de 51,34%, en comparación a la cámara

germinadora 33,77%. En cuanto a los embriones encapsulados luego de cumplir los días de almacenado (20 y 40 días) a 25°C fueron sembrados en 2 ambientes (cámara germinadora e invernadero). El porcentaje de germinación en el ambiente invernadero para los 20 días fue (18,95%), y se incrementó a los 40 días a (23,65%) y en la cámara germinadora para los 20 días fue del 16,69% y para los 40 días el 15%. En la (Figura 4) se observa mayor porcentaje de germinación cuando los embriones encapsulados fueron sembrados directamente en el invernadero (0 días).



**Figura 4.** Porcentaje de germinación de los embriones encapsulados almacenados (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min.de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero)

Se evaluaron también las variables altura (cm), diámetro del tallo (mm), largo de hoja (cm), ancho de hojas, número de hojas, longitud de la raíz (cm) y vigor de las plántulas, los resultados aplicando la prueba de Shapiro Wilks muestra que la especie *Hyeronima macrocarpa* en el ambiente cámara germinadora a los (0 días), arrojaron normalidad en los datos de las variables con  $p > .05$  (Anexo 15). Pero a los 20 y 40 días en la cámara germinadora y en el invernadero a los (0, 20 y 40 días) de almacenado, las variables no presentaron normalidad (Anexo 16).

La prueba Kruskal Wallis muestra que para la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) a los (0, 20 y 40 días) de almacenado, si existieron diferencias significativas en las variables: altura  $K(24) = 47.79$ ,  $p < 0.0001$ , diámetro-tallo (mm)  $K(24) = 32.43$ ,  $p < 0.0001$ , Nro. de hojas  $K(24) = 39.64$ ,  $p < 0.0001$ , ancho-hoja(cm)  $K(24) = 29.05$ ,  $p < 0.0001$ , largo-hoja(cm)  $K(24) = 34.70$ ,  $p < 0.0001$ , longitud de raíz (cm)  $K(24) = 30.61$ ,  $p < 0.0001$  (Anexo 17).

### 6.3.2. Altura

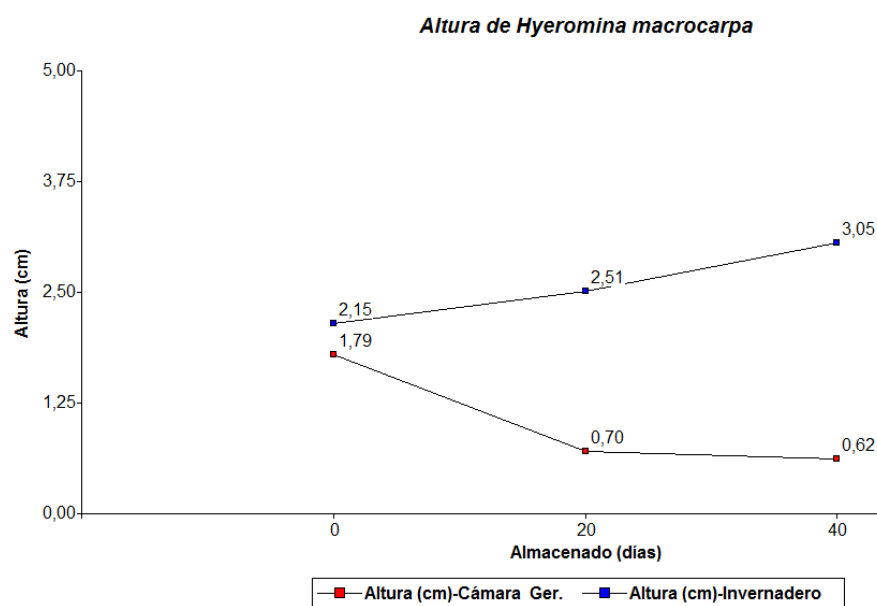
En la (Tabla 7) se observa las diferencias de medianas de la variable altura (cm), la mediana de 40 días almacenado-invernadero (Mdn =2.95) es diferente a las demás medianas.

**Tabla 7**

Diferencia de medianas según de la variable altura (cm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes.

Almacenado(días)	Medianas	Promedios Rangos
40 días- invernadero	2,95	55,75 A
20 días- invernadero	2,20	44,46 B
0 días- invernadero	2,08	41,21 B
0 días- cámara ger.	1,47	23,17 B C
20 días- cámara ger.	1,50	22,33 B C
40 días- cámara ger.	1,50	22,08 B C

En la (Figura 5) se observa que las plántulas provenientes de los embriones encapsulados y almacenados por 40 días, sembrados en el invernadero, obtuvieron un promedio de 3,05 cm de altura y el que presentó menor altura 0,62 cm en la cámara germinadora.



**Figura 5.** Diagrama de puntos sobre la variable altura (cm) almacenamientos a (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).

### 6.3.3. Diámetro

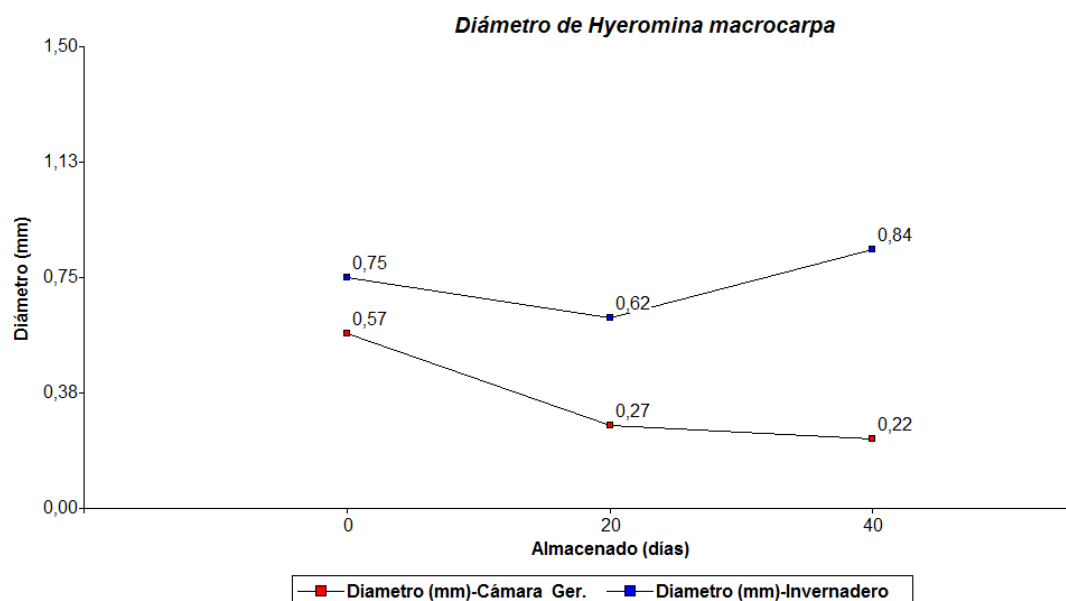
La (Tabla 8) muestra la diferencia de las medianas entre la variable diámetro del tallo (mm) en el invernadero a los 40 días (Mdn =0.85) y a los 0 días (Mdn= 0.70).

**Tabla 8**

Diferencia de medianas de la variable diámetro (mm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes.

Almacenado(días)	Medianas	Promedios	Rangos
40 días- invernadero	0,85	51,58	A
0 días- invernadero	0,70	41,92	A B
20 días- camara ger.	0,67	33,21	B
20 días- invernadero.	0,66	34,71	B
0 días- cámara ger.	0,61	31,92	B
40 días- cámara ger.	0,57	25,67	B

Las plántulas de los embriones encapsulados almacenados por 40 días a 25°C sembrados en el ambiente invernadero, obtuvieron un promedio de 0.84 mm de diámetro de tallo, en comparación en la cámara germinadora, obtuvieron un promedio de 0,22 mm (Figura 6).



**Figura 6.** Diagrama de puntos sobre la variable diámetro (mm) en los diferentes tiempos de almacenamiento (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes (cámara germinadora e invernadero).

#### 6.3.4. Número de hojas, Ancho y largo de las hojas

Las plántulas de los (embriones encapsulados sin almacenamiento y con almacenamiento) de la especie *Hyeronima macrocarpa*, a los primeros 20 días de desarrollo, presentaron 2 hojas inmaduras, excepto las plántulas de los embriones almacenados por 40 días sembrados en el invernadero al final de la evaluación incremento a 4 hojas maduras, además el largo de la hoja fue un promedio de 2,10 cm y con un ancho de 1,66 cm. (Tabla 9)

**Tabla 9**

Promedio de Nro. de hojas, Ancho y largo de las hojas (cm) con relación a los tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la

Almacenado (días)	Ambiente	Nro. de Hojas	Ancho de hojas(cm)	Largo de hojas (cm)
0 días	Cámara Ger.	2	1,40	1,45
20 días	Cámara Ger.	2	1,20	1,26
40 días	Cámara Ger.	2	1,20	1,24
0 días	Invernadero	3	1,44	1,56
20 días	Invernadero	3	1,51	1,64
40 días	Invernadero	4	1,66	2,10

especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero).



### 6.3.5. Vigor

En cuanto al vigor se clasificó de la siguiente manera (MB= Muy Buena: mayor crecimiento de la planta, tallo grueso, hojas verdes, número de hojas), (B=Buena: crecimiento adecuado, hojas normales ni tan verdes ni amarillas, (R= Regular: menor crecimiento de la planta, hojas amarillas, menor número de hojas, tallo delgado). Las plántulas de la especie *Hyeronima macrocarpa* fue la que presentó mayor vigor (MB) son provenientes de los embriones encapsulados almacenados por 40 días a 25°C en el invernadero presentando mayor desarrollo de altura, grosor del tallo, raíz y con mayor número de hojas, en comparación con las plántulas provenientes a los 0 y 20 días de almacenado el vigor fue regular.

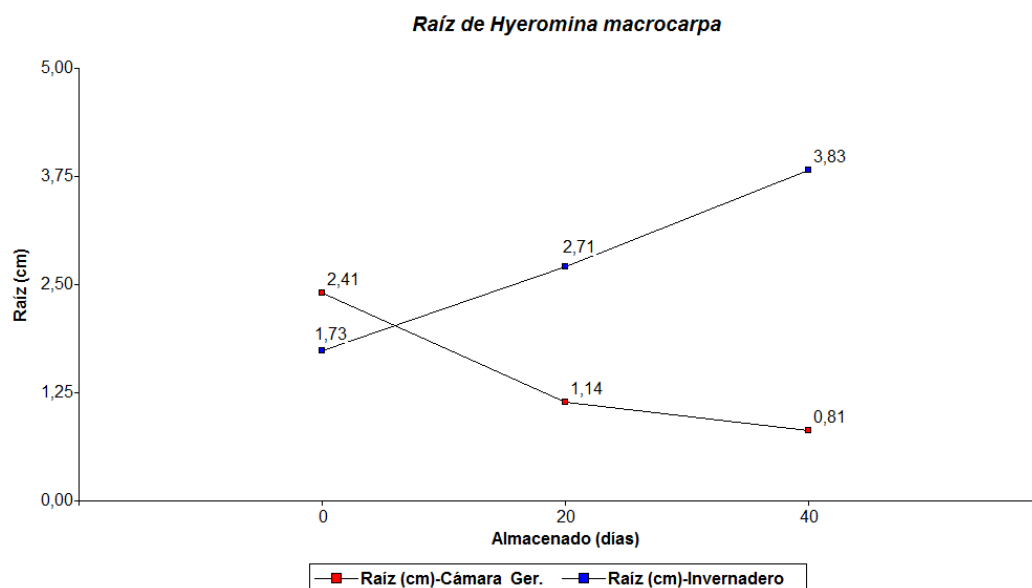
### 6.3.6. Longitud de raíz

En la siguiente (Tabla 10), se observa la diferencia de las medianas entre la variable longitud de la raíz (cm), las plántulas de la *Hyeronima macrocarpa* proveniente de los embriones encapsulados almacenados por 40 días a 25 °C y sembrados en el ambiente invernadero es significativamente diferente a las raíces de las plántulas provenientes de los embriones encapsulados almacenados por (0 y 20 días) y sembrados en los 2 ambientes, es decir que el mejor desarrollo de raíces son provenientes de los embriones encapsulados almacenados por 40 días a 25°C y luego sembrados en el ambiente invernadero una mayor longitud de raíz con un promedio de 3,83 cm., en comparación a las plántulas provenientes de los embriones encapsulados que fueron almacenados por 40 días a 25°C) y sembrados en los ambiente cámara germinadora no obtuvieron mayor desarrollo de raíz con un promedio de 0.81 cm. (Figura 7).

**Tabla 10**

Diferencia de medianas de la variable raíz (cm) en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambientes (cámara germinadora e invernadero).

Almacenado(días)	Medianas	Promedio Rangos
40 días- invernadero	4,75	53,46 A
0 días- cámara ger.	2,75	39,42 B
20 días- invernadero	2,40	37,75 B
20 días- cámara ger.	2,55	36,58 B
40 días- cámara ger.	1,85	27,08 B
0 días- invernadero	1,55	24,71 B



**Figura 7.** Diagrama de puntos sobre la variable raíz (cm) en los diferentes tiempos de almacenamiento (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min de la especie *Hyeronima macrocarpa* en los ambientes cámara germinadora e invernadero.

### 6.3.7. Controles.

Para los controles C1 (sin testa) y C2 (con testa) en la especie *Hyeronima macrocarpa* mediante la prueba de Shapiro-Wilks se comprobó que para el control C1 y C2 no tiene normalidad en los datos entre las variables: altura (cm), diámetro de tallo (mm), largo-ancho de hojas (cm), número de hojas, vigor, longitud de raíz (cm) en los dos ambientes (cámara germinadora e invernadero)  $p < 0.05$  (Anexo 18).

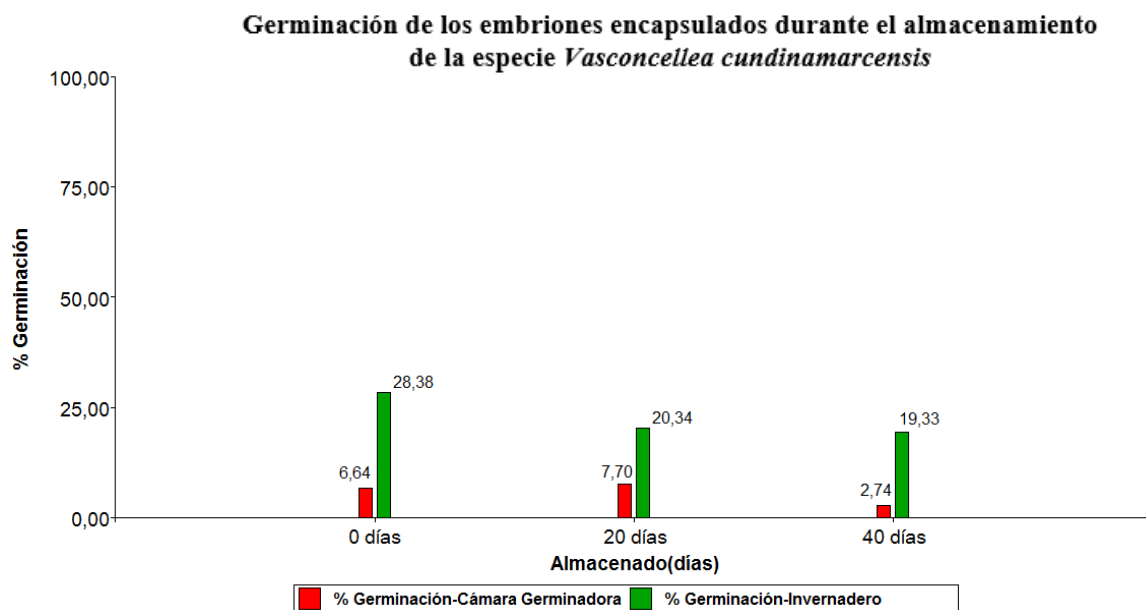




Con la prueba Kruskal Wallis se comprobó que en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) el control C1 y control C2 no existen diferencias significativas en las variables: altura (cm) diámetro (mm), largo de la hoja (cm), ancho de la hoja (cm), número de hojas y longitud de raíz (cm.)  $K(3) = 0.43$ ,  $p > 0.999$  (Anexo 19), C2: altura (cm), diámetro (mm), largo de la hoja (cm), ancho de la hoja (cm)  $K(3) = 0.43$ ,  $p = 0.7000$ , número de hojas  $K(3) = 0.76$ ,  $p = 0.7000$  (Anexo 20).

#### **6.4. Resultados de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) y diferentes tiempos de almacenamiento.**

La especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente invernadero al utilizar las concentraciones de 50mM y 75mM por 30min. presentaron mayor porcentaje de germinación, cuando los embriones encapsulados fueron sembrados directamente sin almacenar (0 días), con un porcentaje de germinación (28,38%), en comparación con la cámara germinadora (6,64%). Los embriones encapsulados almacenados por (20 y 40 días) a 25°C y sembrados en ambiente invernadero, el porcentaje de germinación para los 20 días fue de 20,34% y para los 40 días el 19,33%. Para el ambiente cámara germinadora a los 20 días (7,70 %) y para los 40 días 2,74% (Figura 8).



**Figura 8.** Porcentaje de germinación de los embriones encapsulados almacenados (0,20 y 40 días) utilizando las concentraciones de 50-75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30 min de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en los ambientes (cámara germinadora e invernadero)

La prueba de Shapiro-Wilks en la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* muestra que las semillas artificiales almacenados a (0, 20 y 40 días) sembradas en la cámara germinadora e invernadero no presentó normalidad de datos ( $p < .05$ ), para las variables: altura (cm), diámetro (mm), largo y ancho de la hoja (cm.), longitud de raíz (cm.), Nro. de hojas y vigor, con un  $p < .05$  (Anexo 21 y Anexo 22).

La prueba de Kruskal Wallis muestra que no existe diferencia significativa en los días de almacenado (0, 20 y 40 días) en los dos ambientes, en la cámara germinadora las variables: altura (cm)  $K(24) = 1.10$ ,  $p = 0.2992$ , diámetro (mm)  $K(24) = 1.10$ ,  $p = 0.2991$ , largo de la hoja  $K(24) = 1.12$ ,  $p = 0.2934$ , ancho de la hoja (cm.)  $K(24) = 1.08$ ,  $p = 0.3059$ , longitud de raíz (cm.)  $K(24) = 1.12$ ,  $p = 0.2935$ , Nro. de hojas  $K(24) = 1.07$ ,  $p = 0.3079$  (Anexo 23). En el invernadero las variables: altura (cm)  $K(24) = 2.32$ ,  $p = 0.2741$ , diámetro- tallo (mm)  $K(24) = 1.12$ ,  $p = 0.5359$ , largo de la hoja  $K(24) = 2.06$ ,  $p = 0.3168$ , ancho de la hoja (cm.)  $K(24) = 2.36$ ,  $p = 0.2691$ , longitud de raíz (cm.)  $K(24) = 0.0512$ ,  $p = 0.2935$ , Nro. de hojas  $K(24) = 4.88$ ,  $p = 0.6030$  (Anexo 24).



#### 6.4.1. Controles

Para los controles C1 (sin testa) y C2 (con testa) en la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* no se midieron las variables debido a que no hubo germinación en los dos ambientes (cámara germinadora e invernadero).



## 7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los embriones suspendidos en alginato de sodio al 4% más la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 50 mM y 75mM con un tiempo de inmersión de 30min fueron los tratamientos que mayor porcentaje de germinación obtuvieron, siendo diferente al resto de los tratamientos. Nuestros resultados coinciden con lo que manifiesta Barbotin et al., 1993, quienes han demostrado que la dureza de la cápsula puede variar con la concentración de alginato y la concentración de la solución de cloruro de calcio, influyendo de manera importante sobre la germinación.

Según Naik et al. (2006) realizaron encapsulados a partir de segmentos nodales de fruto de granado y obtuvieron que una combinación de 3% de alginato de sodio y 30 minutos de inmersión en cloruro de calcio de 100 mM, fue la más adecuada para la formación de semillas sintéticas ideales, otro autor Ganapathi et al. (1992) realizó un estudio sobre el efecto de la concentración de alginato de sodio (2, 3 y 4 %) sobre el desarrollo de los ápices meristemáticos de banano, obtuvieron que a medida que se incrementó la concentración de alginato disminuyeron los valores de desarrollo, el mejor resultado fue obtenido con 3 % de alginato y (100%  $\text{CaCl}_2$ ). En nuestros resultados al encapsular embriones cigóticos de las semillas de las especies *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa* a una concentración de (4%) de alginato de sodio más dos concentraciones (50 y 75 mM) de  $\text{CaCl}_2$ , no existió diferencia en los valores de la germinación pero si se obtuvieron diferencias en los tiempos de inmersión en  $\text{CaCl}_2$ , esto podría indicar que los porcentajes de germinación pueden ser afectados con un incremento de la germinación, cuando aumenta el tiempo de exposición de  $\text{CaCl}_2$  reducidos como lo manifiesta Malabadi, & Van Staden (2005); esto podría sugerir que cada especie se comporta de manera diferente y específica dependiendo de la unidad encapsulable (embriones somáticos, embriones cigóticos, propágulos, meristemas).



Los embriones encapsulados en alginato de sodio a 4% sumergidos en  $\text{CaCl}_2$  en un tiempo de 30 min. presentaron mayor porcentaje de germinación, esta respuesta no concuerda con los autores como Castillo et al., (1998), quienes observaron un mayor porcentaje de germinación de embriones somáticos de papaya encapsulados en menor tiempo de exposición al  $\text{CaCl}_2$  (10min.) (Prewin y Wilhelm, 2002; Malabadi & Van Staden, 2005). Esto se debe a que las altas concentraciones o la exposición excesiva de los embriones al agente complejante ( $\text{CaCl}_2$ ) da como resultado una mayor absorción y penetración de  $\text{CaCl}_2$  al embrión, lo que podría generar una inhibición del crecimiento que se refleja en la disminución de la respuesta germinativa y el desarrollo posterior en el campo (Redenbaugh et al., 1986; Malabadi & Van Staden, 2005).

Antonietta et al., (1999) señalan que la presencia del AG3 en el endospermo de embriones somáticos encapsulados de *Citrus reticulata* fue indispensable para la germinación, incrementándose estos valores de un 5.0% (endospermo sin AG3) a un 25% cuando estuvo presente este regulador del crecimiento. En nuestro trabajo no se utilizaron reguladores de crecimiento, esto podría ser una variable a incorporarse en otros estudios y evaluar el comportamiento de los embriones de estas especies cuando se utilicen reguladores de crecimiento.

Según Saiprasad, (2002) señala que los protocormos encapsulados en una matriz constituida por alginato de sodio al 3% en complejo con 75 mM de cloruro de calcio, lograron el 100% de conversión a plántula después de 60 días de almacenamiento a una temperatura de 4°C esto se aplicó en la especie *Dendrobium* 'Sonia', otro estudio realizado por (Ghosh & Sen, 1994), en donde encapsularon embriones somáticos de *Asparagus cooperi* lograron obtener un 30% de germinación después de almacenarlos por 15 días a 4°C. En comparación a nuestros resultados obtenidos los embriones encapsulados y almacenados durante 20 y 40 días a 4°C no presentaron germinación en las 2 especies en estudio por lo que



no concordamos con los autores mencionados anteriormente, al parecer el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento dependen de la fisiología de los embriones de la especie en estudio.

Janeiro et al. (1995), observaron un incremento en la tasa de germinación en embriones almacenados por dos meses comparados a los almacenados por un mes, afirma que la germinación rápida de las semillas sintéticas, depende en particular de la fisiología de los embriones y células inmovilizados (Barbotin, 1993).

El trabajo realizado por Enríquez A. (2013), indica que los embriones encapsulados deben almacenarse durante 40-90 días para alcanzar el estadio de desarrollo adecuado de los embriones somáticos. Nuestros datos indicaron que, los embriones cigóticos encapsulados almacenados por 40 días a 25 °C obtuvieron un mejor desarrollo en cuanto a la altura, diámetro de tallo, Nro. de hojas, longitud de raíz y un buen vigor en comparación a nuestros controles no germinaron.

Las condiciones ambientales constituyen uno de los factores que más afectan la germinación de las capsulas. Redenbaugh et al. (1987) obtuvieron porcentajes de germinación en cultivos de embriones somáticas como alfalfa y apio entre un 30-65 %, sin embargo, la frecuencia de conversión disminuyó entre un 7-10 % cuando estas fueron sembradas en medio de cultivo. En comparación con nuestros resultados concordamos con el autor mencionado anteriormente, podemos mencionar que al trasladar las capsulas para su respectivo desarrollo, en los ambientes (cámara germinadora e invernadero) las capsulas no obtuvieron una buena aclimatización por ende existió muerte del embrión por lo que se obtuvo bajo porcentaje de germinación, además podemos atribuir que la disminución del porcentaje de la germinación de las especies en estudio se debe a que desde un principio se obtuvo baja viabilidad de las semillas, es decir realizamos pruebas de viabilidad aplicando



tetrazolio y se obtuvo los siguientes resultados para la especie *Hyeronima macrocarpa* un porcentaje de viabilidad de 65% y para la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* un 60%.

Fujii et al. (1989) probaron varios ambientes para la adaptación a suelo de las semillas sintéticas de alfalfa y no observaron diferencias en la germinación entre las cámaras de crecimiento y el invernadero, pero las plantas producidas en este último presentaron un crecimiento más vigorosa nivel de invernadero estudiaron varios métodos de irrigación, logrando porcentajes de germinación (36%), superiores a las cámaras de crecimiento con el empleo de aspersores (25%) y cámaras de humedad (21%). Estos autores concluyen que para la producción de trasplantes utilizando semillas sintéticas puede realizarse en invernaderos, donde se puede mantener una elevada humedad con el empleo de nebulizadores u otro tipo de riego fino. Nuestros resultados concuerdan con este autor, en el ambiente invernadero se desarrolló mejor las plántulas provenientes de embriones encapsulados de las especies en estudio, donde se obtuvo un mayor desarrollo de las plántulas.



## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 8.1. Conclusiones

La técnica de encapsulación de embriones pudo ser aplicada a dos especies de importancia económica y ecológica: *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa* permitiendo obtener datos de germinación y desarrollo inicial de las especies.

El endosperma artificial constituido por 4% de alginato de sodio en dos concentraciones de Cloruro de calcio (50mM y 75mM) no fueron significativamente diferente entre ellas, sin embargo mostraron diferencia significativa respecto a los controles que no germinaron.

Pero si mostraron diferencias significativas en los tiempos de inmersión de (10 y 30 minutos), en las dos especies.

Los mejores niveles de germinación para *Vasconcellea cundinamarcensis* fue la concentración de 75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30min con 31,46%, mientras que para *Hyeronima macrocarpa* fue la concentración 75mM de  $\text{CaCl}_2$  por 30minn con un 33,30%, aunque en esta especie no hubo diferencias significativas en los distintos tratamientos, es decir que todos los tratamientos son equivalentes de acuerdo al porcentaje de germinación.

Los embriones encapsulados no mostraron viabilidad cuando fueron almacenados durante 20 y 40 días a una temperatura de 4°C en las 2 especies, mientras que los embriones encapsulados y almacenados por 20 y 40 días a una temperatura de 25 °C, presentó germinación en las dos especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis*.

Las semillas sintéticas de las especie *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* a los 25 días presentaron 2 hojas inmaduras en cuanto a los controles C1 (sin testa) y C2 (con testa) no germinaron.

Las semillas sintéticas de *Hyeronima macrocarpa* sin almacenar sembrados directamente en el invernadero presentaron mayor viabilidad (51,34%), de igual manera para la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* con un porcentaje de viabilidad de (28,38%)





El desarrollo inicial de las plántulas provenientes de semillas sintéticas almacenadas durante 40 días a 25°C y sembrados en el ambiente invernadero presentaron mayor vigor, altura, grosor del tallo, longitud de raíz, Nro. de hojas y longitud-ancho de hojas, en las dos especies en comparación a los controles C1 y C2 no presentaron germinación.

Como conclusión podemos mencionar que las semillas sintéticas compuesto por 4% de alginato de sodio en dos concentraciones de Cloruro de calcio (50mM y 75mM) sumergidas por 30 minutos obtendremos germinación y para tener un buen crecimiento de la planta debemos almacenar los embriones encapsulados por 40 días a una temperatura de 25°C y luego sembrar en el invernadero.

La técnica de encapsulamiento nos ayuda a controlar los tiempos de germinación: “Se puede hacer que la semilla sintética germine en cualquier momento, esto sería un beneficio debido a que existen especies recalcitrantes que no logran la conversión a planta después de su fase de embrión, o lo hacen únicamente en el laboratorio, pero al llegar al vivero o a la plantación no se desarrollan”.



## 8.2. Recomendaciones

Mediante la experiencia obtenida en el desarrollo del experimento y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos recomendar:

Utilizar las concentraciones de cloruro de calcio de 50 mM y 75mM con un tiempo de inmersión de 30 minutos para que las semillas sintéticas alcancen una germinación satisfactoria.

Usar alginato de sodio al 4%, también juega un papel importante en el desarrollo del embrión encapsulado porque esta solución alimenta directamente al embrión, al utilizar esta concentración las perlas son uniformes y podemos manipular.

Se recomienda almacenar los embriones encapsulados durante 40 días a una temperatura de 25°C y luego sembrarlos en el invernadero para obtener un buen desarrollo de las plántulas.

No se recomienda almacenar las semillas sintéticas a una temperatura de 4°C el porcentaje de germinación no será satisfactorio para estas especies *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa*.

Realizar al menos 5 repeticiones para obtener datos más confiables y poder generar una información más precisa.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anttoniotta, G. M.; Fowke, L. C. 1999. Development of White spruce (*Picea Galuca*(Moech) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *Journal Experment Botany*. Vol. 46 (285), pp.433-439.
- Barbotin, J. N., Nava, S. J., Bazinet, C., Kersulec, A., Thomasset, B., & Thomas, D. (1993). Immobilization of whole cells and somatic embryos, pp. 65–95.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2014). Germination Ecology of Seeds with Morphophysiological Dormancy. In *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution Dormancy and Germination*. 2 ed. San Diego, US, Inc.119-143 p.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. (14), 1-16.
- Cadavid, A., Villegas, E., Medina, C., Lobo, M., & Reyes, C. (2003). Caracterización morfológica de caricaceas de altura. En *Memorias IV Seminario Nacional de Frutales de clima frio moderado*. Medellín, Colombia. CDTF, UPB, Corpoica, pp. 55-60.
- Carrasco, B., Ávila, P., Pérez, J., Muñoz, P., García, R., Lavandero, B., Zuita, A., Retamales, J.B. & (2009). Genetic Structure of higlland papayas *Vasconcellea pubescens* (Lennéet C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISRR). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56(3), pp. 331-337.
- Castillo, B, Smith M A L, Yadava U L (1998) Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (3):307-311.
- Cortes, H. (2009). Manual de laboratorio de cultivo de tejidos.
- Dürr, J.B., Dickie, X. (2015). Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: contribution to a seed trait database, pp. 222-232.
- Diallo, I., Wade, M., Sarr, A., & Gaye, A. (2000). Storage of recalcitrant seeds of *Cordyla pinnata* from Senegal. *STORAGE BIOLOGY OF TROPICAL TREE SEEDS*.
- Enríquez-Valencia, A.J. (2013). Transcritos involucrados en la maduración del embrión somático de Musa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 103 pp.
- Fenner, M., & Thompson K. (2006). The ecology of seeds. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ferreira, M. E. (2014). Embriogénese somática de macauba: induçao, regeneraçao e caracterização anatômica. (Trabajo de posgrado, Genética y Mejoramiento). Minas Gerais: Universidade Federal de Vicosá. 66 p.



- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501–523.
- Flores, G., Álvarez, M., Rodríguez, O., & Corona, A. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta veracruzana*.
- Fujii, J.A.; Slade, D.; Redenbaugh, K. 1989. Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial sedes, *In vitro Cell. Dev. Biol.* 25, p. 1179.
- Gantait S., Kundu S., Ali N., & Sahu N. (2015). Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta Physiol Plant*, pp. 37:98.
- Ganapathi, T. L. 2001. Regeneration of plants from alginate–encapsulated somatic embryos of banana cv. rasthali (*Musa* spp. AAB group). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* (37): 178–181.
- Gentil, D. (2001). Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares *Bragantia* 60(3), 149-154.
- Germana, A; Hafiz, A; Micheli, M; Standardi, A. (2007). Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarin Tardivo di Caiculli. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88(1):117-120.
- González O., Silva P., & Espinosa J. (2004). “La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial”. Universidad de Alicante. Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Cuadernos de biodiversidad. Nº 15 pp. 17- 22.
- González, M.E. (2004). Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfológica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. *Biotecnología Vegetal* Vol. 5. Nº2, pp.121 – 119.
- Ghosh B, Sen S. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. *Plant Cell Reports*. 13(7):381-385.
- Hinestroza Cordoba, L., & Lopez Malo, A. (2008). Técnicas de encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros.
- Humanante, M. (2005). “Evaluación del Efecto de cuatro tratamientos pre-germinativos en jiguero (*Aegiphylia ferruginea*) con cuatro tipos de sustrato. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Recursos Naturales.
- IUCN— e World Conservation Union. (2003). e IUCN Red List of reatened Species. IUCN Species Survival Commission. IUCN Gland Switzerland and Cambridge UK. Available at website <http://www.iucnredlist.org>.
- Janeiro, V. L.; Ballester, A.; Vieitez, M. 1997. In vitro response of encapsulated somatic embryos of camelia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51, pp. 119 – 125.
- Jiménez, E., & Quiala. E. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Semilla artificial. pp. 225-240.



- Levitus, G., et al., (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Malabadi R., & J. Van Staden. (2005). Almacenamiento y germinación de alginato de sodio, embriones somáticos encapsulados derivados de los ápices de brotes vegetativos de árboles de *Pinus patula* maduros. *Planta celular tiss.Organ Cult.* (82), 259-265.
- Maruyama, E., Y., Hosoi, & Ishii, K. (2003). Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sib. et Zucc.), (8), 1-8.
- Moreno, M. E. (1996). Analisis fisico y biologico de semillas.3<sup>a</sup> ed. UNAM. Mexico. pp. 113-122.
- Morales, E., & Cano, J. (2012). Semillas sintéticas. México: Ciencia y desarrollo. Obtenido de [www.cyd.conacyt.gob.mx/258/articulos/semillassinteticas.html](http://www.cyd.conacyt.gob.mx/258/articulos/semillassinteticas.html).
- Müller, J. (2003). El Motilón, *Hyeronima Macrocarpa*: especie promisoría para la región Andina Ecuatoriana. Proyecto Apoyo al Desarrollo Forestal Comunal en los Andes del Ecuador.
- Murashige, T. (1977). Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae*, (78), 17-30.
- MAE. (2011). Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental. Ministerio del Ambiente del Ecuador. Quito.
- Onishi, N. Y. (1994.) Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp.137–145.
- Palanyandy, S.R., Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U., Subramaniam, S., Aziz, M. A, Sarifa SRSA, Roowi, S.H (2014). Estudio de desarrollo *in vitro* de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) Desde suspensión celular mediante microscopía electrónica de barrido. *Acta Physiol Plant* (35) 1727–1733.
- Pattnaik, S. K., & Chan, P. K. (2000). Artificial seed as an aid to clone white mulberry. Abstract of the International Workshop and Bioencapsulation V, Potsdam, Germany, pp.165 – 168.
- Patel, A.V., Pusch, G., Mix-Wagner. (2000.) A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Rep.* (19), 868-874.
- Pérez García, F., & Pita Villamil, J. (2014). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. ministerio de agricultura, pesca y alimentación, pp. 3-9.
- Prado, L., & Valdebenito, H. (2000). Contribución a la fenología de especies forestales nativas Andinas de Bolivia y Ecuador. Interoperation-FOSEFOR. Quito; Ecuador, 206 p.
- Prewin, C., & E. Wilhelm. 2002. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *In Vitro Cell. Dev. -Pl.* 39:613-617.



- Pritchard (2004). Classification of seed storage types for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. Washington, DC.
- Quintanilla, Y. D. (1995). Caracterización de la papaya (*Carica pubescens* Lenné et Koch) de Cobquecura para aptitud industrial. Memoria título Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía Universidad de Concepción. Chillán, Chile.
- Reinert, J. (1958) Naturwiss (45),344-345
- Rai, M. K. P., Asthana, S. K., Singh, V.S., Jaiswal, U. & Jaiswal (2009). The encapsulation technology in fruit plants- a review. Biotechnology Advances, 27, pp. 671 -679.
- Rani, V., Singh, K., Shiran, B., Nandy, S., Goel, S., Devarumath, R., Sreenath, H. & Raina, S. (2002). Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic Cultivo de tejidos y transformación genética de café 83 Revista de Investigación N° 71 Vol 34. Septiembre- Diciembre 2010 embryogenesis-derived plants of allotetraploid Coffea arabica L. (Rubiaceae). Plant Cell Rep, (19), 1013-1020
- Redenbaugh, K., Fujii, J., Slade, D., Viss, P., & Kossler, M. (1991). Artificial seeds-encapsulated embryos. In: Bajaj YPS (ed) High technology and micropropagation I. Biotechnology in agriculture and forestry, vol.17. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 395–416.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., Fujii, J.A. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortScience.22, pp. 803-807.
- Roberts, E. H. (1973). Predicting the storage life of seeds. Seed Sci Technol, pp.499 -514.
- Saiprasad, G. Y. 2002. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. Indian Journal of Plant Physiology, 42–48.
- Schmidt, L. H. (2000). Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre.
- Soto, I. (2016). “Germinación, microinjección y cultivo de callos in vitro de *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo y *Vasconcellea pubescens*”, Argentina.
- Steward F.C., Mapes, M. O., Mears, K., (1958) Amer J Bot (45), 705-708
- Torres, A., (2006). Development, storage and germination of seeds of tropical fleshyfruited species of South America, Agriculture, University of Reading.
- Utomo, H. S., Wenefrida, M. M., Meche, J.L., & Nash. (2008). Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass-produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). Plant Cell Tiss. Organ Cult., (92), 281-291.
- Vargas, W. (2002). Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y Los Andes Centrales. Universidad de Caldas, 278p.
- Venier, P., Carrizo, C., Cabido, M., & Funes, G. (2012). Survival and germination of three hard-seeded Acacia species after simulated cattle ingestion: the importance of the seed coat structure. South African Journal of Botany 79: 19-24.



- Yucesan, B., Müller-Uri, F., Kreis, W., & Gürel, E. (2014) Cardenolide estimation in callus-mediated regenerant of *Digitalis lamarckii* Ivanina (dwarf foxglove). In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*, (50), 137-142.
- Zúñiga, P.T. (2006). Estudio de la propagación por técnicas tradicionales y seguimiento de la adaptación en campo de 12 especies andinas enmarcadas en el proyecto de uso sostenible. Informe técnico inédito. Jardín Botánico José Celestino Mutis - Subdirección Científica. Bogotá.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* en las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (50mM-75mM) y tiempos de inmersión (10 y 30 min).

Concentración	Tiempo_inmer.	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
50mM	10min	% Germinación	60	11,75	17,5	0,65	<0,0001
50mM	30min	% Germinación	60	22,14	22,9	0,78	<0,0001
75mM	10min	% Germinación	60	15,83	21,5	0,74	<0,0001
75mM	30min	% Germinación	60	23,98	26,2	0,78	<0,0001

**Anexo 2.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis*

Variable	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	50 mM	120	16,95	20,97	0,00	117,41	0,47	0,4476
% Germinación	75 mM	120	19,91	24,23	0,00	123,59		

en cuanto a concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

**Anexo 3.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Hyeronima macrocarpa* y *Vasconcellea cundinamarcensis* con relación al tiempo de inmersión en  $\text{CaCl}_2$ .

Variable	Tiempo inmersión	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	10 min	120	13,79	19,63	0,00	107,98	7,81	0,0021
% Germinación	30 min	120	23,06	24,55	26,57	133,02		

**Anexo 4.** Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las 2 especies en estudio respecto al ambiente.

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Ambiente	% Germinación	Cámara Germinadora	Invernadero	120	120	12,43	24,43	19,12	24,35	12520	0,0001

**Anexo 5.** Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a las especies en estudio.

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Ambiente	% Germinación	Hyeronima macrocarpa	Vasconcellea cundinamarcensis	120	120	23,33	13,52	24,34	19,75	16054	0,0011



**Anexo 6.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente cámara germinadora.

Variable	Trat.	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	T1	15	0,00	0,00	0,00	28,00	6,56	0,079
% Germinación	T2	15	11,47	14,87	0,00	40,97		
% Germinación	T3	15	0,00	0,00	0,00	39,23		
% Germinación	T4	15	10,54	15,87	0,00	40,00		

**Anexo 7.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente invernadero.

Variable	Trat.	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	T1	15	9,7	14,52	0	26,00	7,38	0,0395
% Germinación	T2	15	28,23	25,57	39,23	40,07		
% Germinación	T3	15	16,78	14,54	26,57	32,27		
% Germinación	T4	15	31,46	27,54	39,23	42,07		

**Anexo 8.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* en el ambiente cámara germinadora e invernadero.

Variable	Tiempo inmersión	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	C1 (sin testa)	3	0,00	0,00	0,00	3,50	0,00	<0,001
% Germinación	C2 (con testa)	3	0,00	0,00	0,00	3,50		

**Anexo 9.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie *Hyeronima macrocarpa* en el ambiente cámara germinadora.

Variable	Trat.	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	T1	15	17,33	23,74	0,00	31,53	2,86	0,6317
% Germinación	T2	15	24,00	28,49	20,00	36,17		
% Germinación	T3	15	18,67	24,46	0,00	33,07		
% Germinación	T4	15	22,67	28,15	0,00	34,63		

**Anexo 10.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas sintéticas con relación a los tratamientos de la especie *Hyeronima macrocarpa* en el ambiente invernadero.

Variable	Trat.	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	T1	15	20,00	20,00	20,00	30,40	4,32	0,448
% Germinación	T2	15	29,33	29,15	20,00	35,03		
% Germinación	T3	15	30,67	33,69	20,00	34,83		
% Germinación	T4	15	38,67	36,62	40,00	38,80		

**Anexo 11.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie *Hyeronima macrocarpa* en ambiente cámara

Variable	Tiempo inmersión	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	C1 ( sin testa)	3	0,00	0,00	0,00	2,50	1,71	0,4000
% Germinación	C2 ( con testa)	3	30,00	31,86	26,57	4,50		

germinadora.

**Anexo 12.** Prueba de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de germinación de las semillas en cuanto a los controles de la especie *Hyeronima macrocarpa* en el ambiente

Variable	Tiempo inmersión	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
% Germinación	C1 (sin testa)	3	8,86	15,34	0,00	3,50	0,00	>0,999
% Germinación	C2 (con testa)	3	8,86	15,34	0,00	3,50		

invernadero.

**Anexo 13.** Prueba de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados en los diferentes tiempos de almacenado de las 2 especies en estudio.

Almacenado	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
0 días	% Viabilidad	48	11,75	17,5	0,65	<0,0001
20 días	% Viabilidad	96	22,14	22,9	0,78	<0,0001
40 días	% Viabilidad	96	15,83	21,5	0,74	<0,0001

**Anexo 14.** Prueba de Mann Whitney para la variable porcentaje de germinación de los embriones encapsulados con respecto al ambiente, días de almacenado y su temperatura.

Almacenado (días)	T (°C)	Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
0	NA	Ambiente	% Germinación	Cámara Ger.	Invernadero	24	24	20,01	39,86	20,38	19,67	449,00	0,0032
20	25	Ambiente	% Germinación	Cámara Ger.	Invernadero	24	24	24,38	39,64	20,10	15,29	468,50	0,0111
20	4	Ambiente	% Germinación	Cámara Ger.	Invernadero	24	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	sd
40	25	Ambiente	% Germinación	Cámara Ger.	Invernadero	24	24	17,74	42,98	22,62	19,07	428,50	0,007
40	4	Ambiente	% Germinación	Cámara Ger.	Invernadero	24	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	sd

**Anexo 15.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente cámara germinadora de la especie *Hyeronina macrocarpa*.

Almacenado	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
0 días	Altura (cm)	24	1,11	0,70	0,91	0,3640
0 días	Diámetro (mm)	24	0,57	0,44	0,92	0,4005
0 días	# Hojas	24	1,58	1,00	0,87	0,1211
0 días	Ancho hoja (cm)	24	0,50	0,28	0,80	0,3104
0 días	Largo hoja (cm)	24	0,65	0,37	0,90	0,2758
0 días	Raíz (cm)	24	1,38	0,48	0,70	<0,0001
0 días	Vigor	24	0,59	0,47	0,76	<0,0001
20 días	Altura (cm)	24	0,50	0,71	0,69	<0,0001
20 días	Diámetro (mm)	24	0,27	0,36	0,69	<0,0001
20 días	# Hojas	24	0,71	0,91	0,64	<0,0001
20 días	Ancho hoja (cm)	24	0,25	0,35	0,69	<0,0001
20 días	Largo hoja (cm)	24	0,34	0,46	0,70	<0,0001
20 días	Raíz (cm)	24	1,29	0,43	0,67	<0,0001
20 días	Vigor	24	0,48	0,74	0,68	<0,0001
40 días	Altura (cm)	24	0,49	0,74	0,27	<0,0001
40 días	Diámetro (mm)	24	0,23	0,34	0,66	<0,0001
40 días	# Hojas	24	0,78	1,13	0,64	<0,0001
40 días	Ancho hoja (cm)	24	0,27	0,40	0,67	<0,0001
40 días	Largo hoja (cm)	24	0,35	0,51	0,67	<0,0001
40 días	Raíz (cm)	24	1,29	0,43	0,67	<0,0001
40 días	Vigor	24	0,41	0,46	0,69	<0,0001

**Anexo 16.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie *Hyeronina macrocarpa*.

Almacenado	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
0 días	Altura (cm)	24	1,20	0,39	0,93	0,5480
0 días	Diámetro (mm)	24	0,75	0,26	0,83	0,0287
0 días	Nro. Hojas	24	2,75	0,87	0,88	0,1650
0 días	Ancho hoja (cm)	24	0,54	0,21	0,86	0,0728
0 días	Largo hoja (cm)	24	0,73	0,25	0,91	0,3456
0 días	Raíz (cm)	24	1,64	0,21	0,83	0,0369
0 días	Vigor	24	0,56	0,48	0,76	<0,0001
20 días	Altura (cm)	24	0,61	0,78	0,77	<0,0001
20 días	Diámetro (mm)	24	0,31	0,37	0,77	<0,0001
20 días	Nro. Hojas	24	1,33	1,32	0,75	<0,0001
20 días	Ancho hoja (cm)	24	0,33	0,41	0,78	<0,0001
20 días	Largo hoja (cm)	24	0,44	0,52	0,77	<0,0001
20 días	Raíz (cm)	24	1,44	0,54	0,75	<0,0001
20 días	Vigor	24	0,44	0,50	0,78	<0,0001
40 días	Altura (cm)	24	0,81	0,90	0,75	<0,0001
40 días	Diámetro (mm)	24	0,42	0,46	0,75	<0,0001
40 días	Nro. Hojas	24	1,08	1,18	0,72	<0,0001
40 días	Ancho hoja (cm)	24	0,27	0,40	0,67	<0,0001
40 días	Largo hoja (cm)	24	0,59	0,66	0,75	<0,0001
40 días	Raíz (cm)	24	1,58	0,65	0,71	<0,0001
40 días	Vigor	24	0,40	0,73	0,68	<0,0001



**Anexo 17.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables: altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho-largo de la hoja y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en los 2 ambiente cámara germinadora e invernadero de la especie *Hyeronina macrocarpa*.

Variable	Almacenado (días)/Ambiente	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
Altura (cm)	0 Cámara Ger.	24	1,79	1,11	1,75	55,17	47,79	<0,0001
Altura(cm)	0 Invernadero	24	2,15	0,40	2,08	65,21		
Altura(cm)	20 Cámara Ger	24	0,70	0,88	0,00	30,33		
Altura (cm)	20 Invernadero	24	2,51	1,06	2,20	68,46		
Altura (cm)	40 Cámara Ger	24	0,62	0,94	0,00	29,29		
Altura (cm)	40 Invernadero	24	3,05	1,09	2,95	79,75		
Diámetro (mm)	0 Cámara Ger.	24	0,57	0,44	0,61	53,92	32,43	<0,0001
Diámetro (mm)	0 Invernadero	24	0,75	0,26	0,70	65,92		
Diámetro (mm)	20 Cámara Ger.	24	0,27	0,36	0,00	35,85		
Diámetro (mm)	20 Invernadero	24	0,62	0,27	0,60	58,71		
Diámetro (mm)	40 Cámara Ger.	24	0,22	0,33	0,00	31,08		
Diámetro (mm)	40 Invernadero	24	0,84	0,25	0,85	75,58		
Nro. de hojas	0 Cámara Ger.	24	1,58	1,00	2,00	50,29	39,64	<0,0001
Nro. de hojas	0 Invernadero	24	2,75	0,87	3,00	75,13		
Nro. de hojas	20 Cámara Ger.	24	0,71	0,91	0,00	31,31		
Nro. de hojas	20 Invernadero	24	2,67	0,98	2,50	71,83		
Nro. de hojas	40 Cámara Ger.	24	0,75	1,11	0,00	32,58		
Nro. de hojas	40 Invernadero	24	2,17	0,58	2,00	62,96		
Ancho- hoja (cm)	0 Cámara Ger.	24	1,01	0,58	1,05	51,83	29,05	<0,0001
Ancho- hoja (cm)	0 Invernadero	24	1,08	0,41	1,05	53,46		
Ancho hoja (cm)	20 Cámara Ger.	24	0,51	0,71	0,00	35,19		
Ancho- hoja (cm)	20 Invernadero	24	1,32	0,70	1,30	63,25		
Ancho- hoja(cm)	40 Cámara Ger.	24	0,53	0,82	0,00	35,17		
Ancho- hoja(cm)	40 Invernadero	24	1,77	0,53	1,90	78,75		
Largo - hoja (cm)	0 Cámara Ger.	24	1,17	0,63	1,30	46,71	34,70	<0,0001
Largo- hoja (cm)	0 Invernadero	24	1,46	0,49	1,45	53,67		
Largo- hoja (cm)	20 Cámara Ger.	24	0,69	0,93	0,00	35,29		
Largo- hoja (cm)	20 Invernadero	24	1,73	0,67	1,85	65,46		
Largo- hoja(cm)	40 Cámara Ger.	24	0,66	1,00	0,00	34,38		
Largo- hoja(cm)	40 Invernadero	24	2,83	1,67	2,40	82,83		
Raíz (cm)	0 Cámara Ger.	24	2,41	1,24	2,75	61,42	30,61	<0,0001
Raíz (cm)	0 Invernadero	24	1,73	0,77	1,55	48,71		
Raíz (cm)	20 Cámara Ger.	24	1,14	1,47	0,00	37,54		
Raíz (cm)	20 Invernadero	24	2,71	1,71	2,40	61,75		
Raíz (cm)	40 Cámara Ger.	24	0,81	1,28	0,00	31,79		
Raíz (cm)	40 Invernadero	24	3,83	1,54	4,75	77,46		

**Anexo 18.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para los controles C1 y C2 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie *Hyeronima macrocarpa*.

Trat.	Ambiente	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
C1	Cámara Ger.	Altura (cm)	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Diámetro (mm)	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Nro. Hojas	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Ancho hoja (cm)	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Largo hoja (cm)	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Raíz (cm)	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Cámara Ger	Vigor	3	0,00	0,00	sd	>0,9999
C1	Invernadero	Altura (cm)	3	1,33	2,31	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Diámetro (mm)	3	0,49	0,85	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Nro. Hojas	3	1,33	2,31	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Ancho hoja (cm)	3	0,47	0,81	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Largo hoja (cm)	3	0,70	1,21	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Raíz (cm)	3	2,44	2,47	0,75	<0,0001
C1	Invernadero	Vigor	3	0,48	0,74	0,75	<0,0001
C2	Cámara Ger.	Altura (cm)	3	2,47	2,47	0,98	0,0049
C2	Cámara Ger	Diámetro (mm)	3	0,63	0,78	0,92	0,0035
C2	Cámara Ger	Nro. Hojas	3	1,83	1,76	0,99	0,0048
C2	Cámara Ger	Ancho hoja (cm)	3	0,82	0,91	0,97	0,0038
C2	Cámara Ger	Largo hoja (cm)	3	1,07	1,22	0,96	0,0049
C2	Cámara Ger	Raíz (cm)	3	2,37	2,45	0,98	0,0049
C2	Cámara Ger	Vigor	3	0,40	0,74	0,75	0,0021
C2	Invernadero	Altura (cm)	3	0,90	1,56	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Diámetro (mm)	3	0,38	0,66	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Nro. Hojas	3	0,67	1,15	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Ancho hoja (cm)	3	0,37	0,64	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Largo hoja (cm)	3	0,50	0,87	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Raíz (cm)	3	1,73	3,00	0,75	<0,0001
C2	Invernadero	Vigor	3	0,60	0,78	0,75	<0,0001

**Anexo 19.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para el C1 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie *Hyeronima macrocarpa*.

Variable	Trat	Ambiente	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
Altura (cm)	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,47	>0,9999
Altura(cm)	C1	Invernadero	3	0,93	1,14	0,00		
Diámetro (mm)	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Diámetro (mm)	C1	Invernadero	3	0,49	0,85	0,00		
Nro. hojas	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Nro. hojas	C1	Invernadero	3	1,33	2,31	0,00		
Largo-hoja (cm)	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Largo-hoja (cm)	C1	Invernadero	3	0,70	1,21	0,00		
Ancho-hoja(cm)	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Ancho-hoja(cm)	C1	Invernadero	3	0,47	0,81	0,00		
Raíz (cm)	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Raíz (cm)	C1	Invernadero	3	2,44	2,47	0,00		
Vigor	C1	Cámara Ger.	3	0,00	0,00	0,00	0,43	>0,9999
Vigor	C1	Invernadero	3	0,48	0,74	0,00		

**Anexo 20.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz para el C2 en los dos ambientes (Cámara germinadora e invernadero) de la especie *Hyeronima macrocarpa*.

Variable	Trat.	Ambiente	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
Altura (cm)	C2	Cámara Ger.	3	0,90	1,56	0,00	0,43	0,7000
Altura(cm)	C2	Invernadero	3	2,27	2,47	1,90		
Diámetro (mm)	C2	Cámara Ger.	3	0,38	0,66	0,00	0,43	0,7000
Diámetro (mm)	C2	Invernadero	3	0,63	0,78	0,38		
Nro. hojas	C2	Cámara Ger.	3	0,67	1,15	0,00	0,76	0,7000
Nro. hojas	C2	Invernadero	3	1,83	1,76	2,00		
Largo-hoja (cm)	C2	Cámara Ger.	3	0,50	0,87	0,00	0,43	0,7000
Largo-hoja (cm)	C2	Invernadero	3	1,07	1,22	0,80		
Ancho-hoja(cm)	C2	Cámara Ger.	3	0,37	0,64	0,00	0,43	0,7000
Ancho-hoja(cm)	C2	Invernadero	3	0,82	0,91	0,65		
Raíz (cm)	C2	Cámara Ger.	3	1,73	3,00	0,00	0,43	0,7000
Raíz (cm)	C2	Invernadero	3	2,37	2,45	2,10		
Vigor	C2	Cámara Ger.	3	0,40	0,74	0,00	0,43	0,7000
Vigor	C2	Invernadero	3	0,60	0,78	0,39		

**Anexo 21.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente cámara germinadora de la especie *Vasconcellea cundinamarzensis*.

Almacenado	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
0 días	Altura (cm)	24	0,23	0,43	0,58	<0,0001
0 días	Diámetro (mm)	24	0,09	0,16	0,57	0,0002
0 días	Nro. Hojas	24	0,33	0,65	0,60	<0,0001
0 días	Ancho hoja (cm)	24	0,10	0,18	0,57	<0,0001
0 días	Largo hoja (cm)	24	0,15	0,27	0,56	<0,0001
0 días	Raíz (cm)	24	1,21	0,39	0,57	<0,0001
0 días	Vigor	24	0,62	0,63	0,80	<0,0001
20 días	Altura (cm)	24	0,39	0,78	0,58	<0,0001
20 días	Diámetro (mm)	24	0,19	0,36	0,58	<0,0001
20 días	Nro. Hojas	24	0,54	1,02	0,57	<0,0001
20 días	Ancho hoja (cm)	24	0,16	0,31	0,57	<0,0001
20 días	Largo hoja (cm)	24	0,20	0,40	0,57	<0,0001
20 días	Raíz (cm)	24	1,28	0,50	0,55	<0,0001
20 días	Vigor	24	0,46	0,75	0,68	<0,0001
40 días	Altura (cm)	24	0,14	0,52	0,35	<0,0001
40 días	Diámetro (mm)	24	0,29	0,44	0,67	<0,0001
40 días	Nro. Hojas	24	0,21	0,72	0,37	<0,0001
40 días	Ancho hoja (cm)	24	0,38	0,64	0,65	<0,0001
40 días	Largo hoja (cm)	24	0,40	0,65	0,66	<0,0001
40 días	Raíz (cm)	24	1,09	0,32	0,34	<0,0001
40 días	Vigor	24	0,51	0,48	0,68	<0,0001

**Anexo 22.** Prueba de Shapiro-Wilk para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie *Vasconcellea cundinamarzensis*.

Almacenado	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
0 días	Altura (cm)	24	1,47	1,11	0,92	0,0248
0 días	Diámetro (mm)	24	0,60	0,47	0,92	0,0245
0 días	Nro. Hojas	24	2,17	1,40	0,87	0,0247
0 días	Ancho hoja (cm)	24	0,10	0,17	0,57	0,0001
0 días	Largo hoja (cm)	24	0,15	0,27	0,56	0,0042
0 días	Raíz (cm)	24	1,94	0,39	0,78	0,0048
0 días	Vigor	24	0,61	0,46	0,76	0,0001
20 días	Altura (cm)	24	0,93	1,14	0,76	<0,0001
20 días	Diámetro (mm)	24	0,49	0,59	0,71	<0,0001
20 días	Nro. Hojas	24	1,08	1,25	0,69	<0,0001
20 días	Ancho hoja (cm)	24	0,47	0,55	0,71	<0,0001
20 días	Largo hoja (cm)	24	0,58	0,68	0,72	<0,0001
20 días	Raíz (cm)	24	1,49	0,58	0,73	<0,0001
20 días	Vigor	24	0,48	0,74	0,66	<0,0001
40 días	Altura (cm)	24	0,96	1,25	0,69	<0,0001
40 días	Diámetro (mm)	24	0,44	0,55	0,71	<0,0001
40 días	Nro. Hojas	24	1,21	1,56	0,75	<0,0001
40 días	Ancho hoja (cm)	24	0,36	0,47	0,71	<0,0001
40 días	Largo hoja (cm)	24	0,49	0,63	0,72	<0,0001
40 días	Raíz (cm)	24	1,49	0,60	0,74	<0,0001



40 días	Vigor	24	0,40	0,45	0,70	<0,0001
---------	-------	----	------	------	------	---------

**Anexo 23.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, # de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente cámara germinadora de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*.

Variable	Almacenado (días)	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	p
Altura (cm)	0	24	0,23	0,43	0,00	31,92	1,10	0,2992
Altura(cm)	20	24	0,39	0,78	0,00	32,67		
Altura(cm)	40	24	0,14	0,52	0,00	27,63		
Diámetro (mm)	0	24	0,09	0,16	0,00	31,50	1,10	0,2991
Diámetro (mm)	20	24	0,19	0,36	0,00	32,83		
Diámetro (mm)	40	24	0,07	0,27	0,00	27,67		
Nro. de hojas	0	24	0,33	0,65	0,00	31,83	1,07	0,3079
Nro. de hojas	20	24	0,54	1,02	0,00	32,67		
Nro. de hojas	40	24	0,21	0,72	0,00	27,67		
Largo de hoja (cm)	0	24	0,33	0,65	0,00	31,83	1,12	0,2934
Largo de hoja (cm)	20	24	0,54	1,02	0,00	32,67		
Largo de hoja (cm)	40	24	0,21	0,72	0,00	27,67		
Ancho de hoja (cm)	0	24	0,10	0,18	0,00	32,00	1,08	0,3059
Ancho de hoja (cm)	20	24	0,16	0,31	0,00	32,00		
Ancho de hoja (cm)	40	24	0,06	0,22	0,00	32,60		
Raíz (cm)	0	24	1,21	0,39	1,00	31,50	1,12	0,2935
Raíz (cm)	20	24	1,29	0,50	1,00	32,85		
Raíz (cm)	40	24	1,09	0,32	1,00	27,65		

**Anexo 24.** Prueba de Kruskal Wallis para las variables altura, diámetro, Nro. de hojas, ancho y largo de la hoja, vigor, y longitud de la raíz en los diferentes tiempos de almacenado (0, 20 y 40 días) en el ambiente invernadero de la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*.

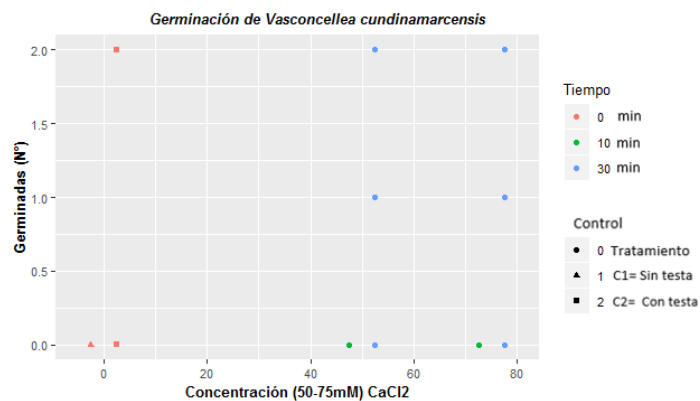


Variable	Almacenado (días)	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio Rangos	H	P
Altura (cm)	0	24	1,47	1,11	1,00	37,38	2,32	0,2741
Altura(cm)	20	24	0,93	1,14	0,00	28,73		
Altura(cm)	40	24	0,96	1,25	0,00	28,83		
Diámetro (mm)	0	24	0,60	0,47	0,44	35,17	1,12	0,5359
Diámetro (mm)	20	24	0,49	0,59	0,00	29,90		
Diámetro (mm)	40	24	0,44	0,55	0,00	28,77		
Nro. de hojas	0	24	2,17	1,40	2,50	40,42	4,88	0,6030
Nro. de hojas	20	24	1,08	1,25	0,00	27,50		
Nro. de hojas	40	24	1,21	1,56	0,00	28,54		
Largo de hoja (cm)	0	24	0,78	0,60	0,60	36,79	2,06	0,3168
Largo de hoja (cm)	20	24	0,58	0,68	0,00	29,79		
Largo de hoja (cm)	40	24	0,49	0,63	0,00	28,06		
Ancho de hoja (cm)	0	24	0,60	0,45	0,48	36,83	2,36	0,2691
Ancho de hoja (cm)	20	24	0,47	0,55	0,00	30,48		
Ancho de hoja (cm)	40	24	0,36	0,47	0,00	27,35		
Raíz (cm)	0	24	1,94	0,47	2,05	40,92	5,34	0,0512
Raíz (cm)	20	24	1,49	0,58	1,00	27,96		
Raíz (cm)	40	24	1,49	0,60	1,00	27,83		

**Anexo 25.** Efecto de concentración (50-75mM) de CaCl<sub>2</sub> y tiempo de inmersión (10-30min.) sobre el número total de semillas sintéticas germinadas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero).

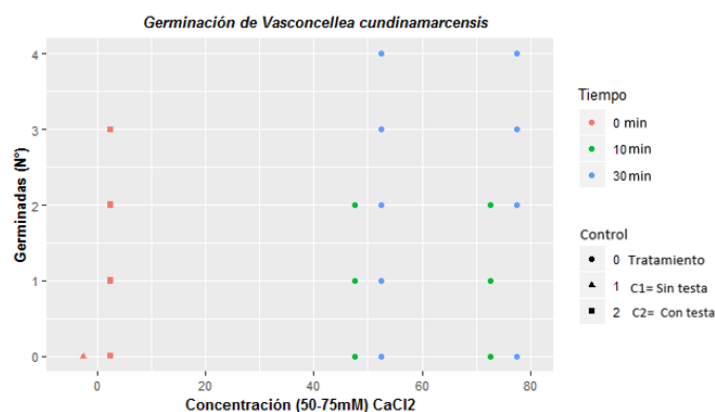
## CÁMARA GERMINADORA

A



## INVERNADERO

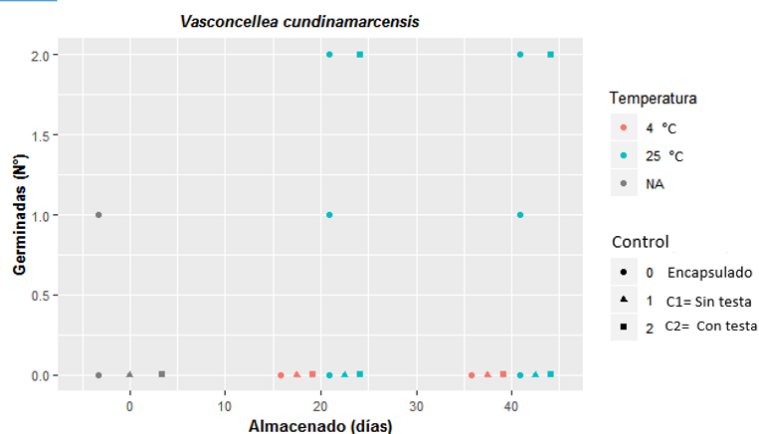
B



**Anexo 26.** Número total de semillas sintéticas germinadas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en los dos ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenado (0,20 y 40 días) y su temperatura (4°C y 25°C).

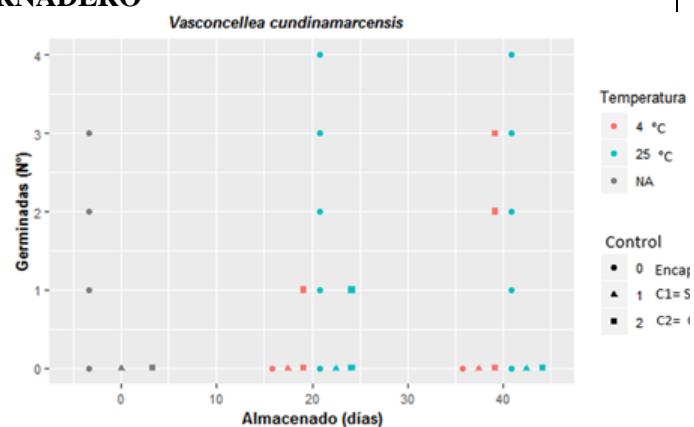
### CÁMARA GERMINADORA

A



### INVERNADERO

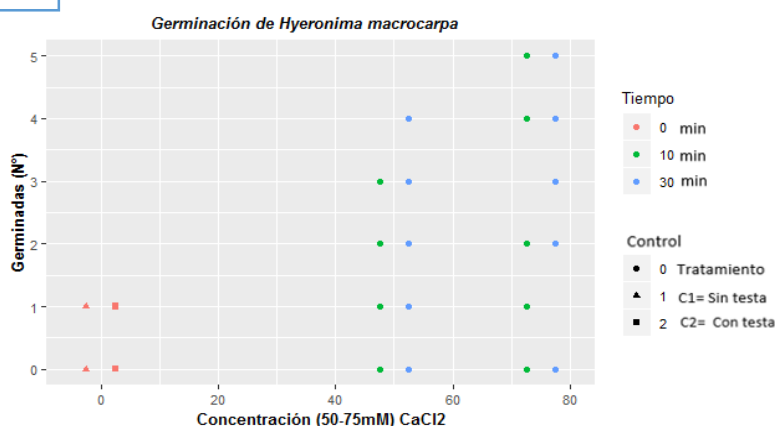
B



**Anexo 27.** Efecto de concentración (50-75mM) de CaCl<sub>2</sub> y tiempo de inmersión (10-30min.) sobre el número total de semillas sintéticas germinadas de *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero).

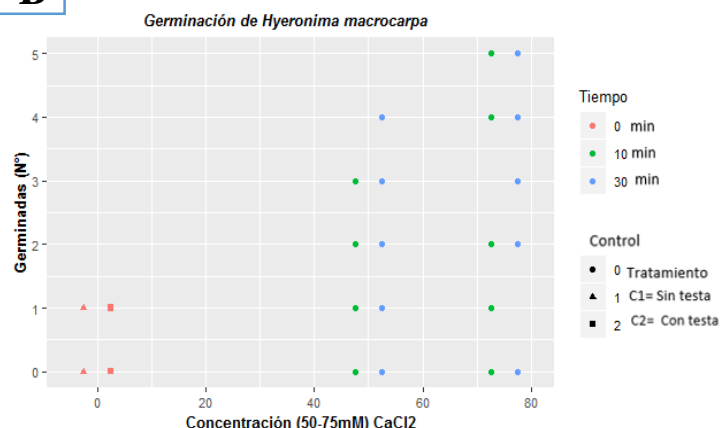
### CÁMARA GERMINADORA

A



### INVERNADERO

B

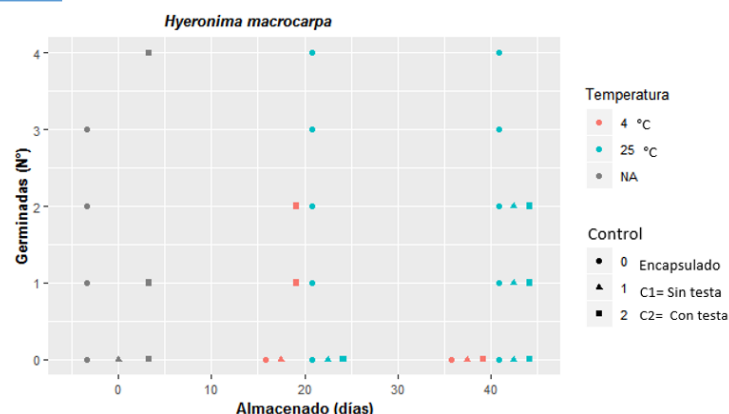




**Anexo 28.** Número total de semillas sintéticas germinadas de *Hyeronima macrocarpa* en los dos ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenado (0,20 y 40 días) y su temperatura (4°C y 25°C).

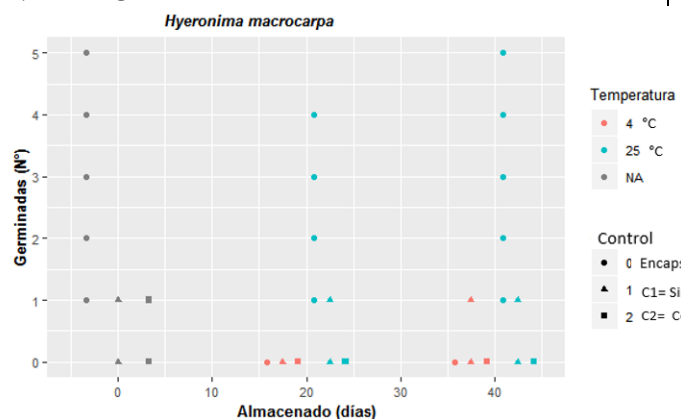
### CÁMARA GERMINADORA

A



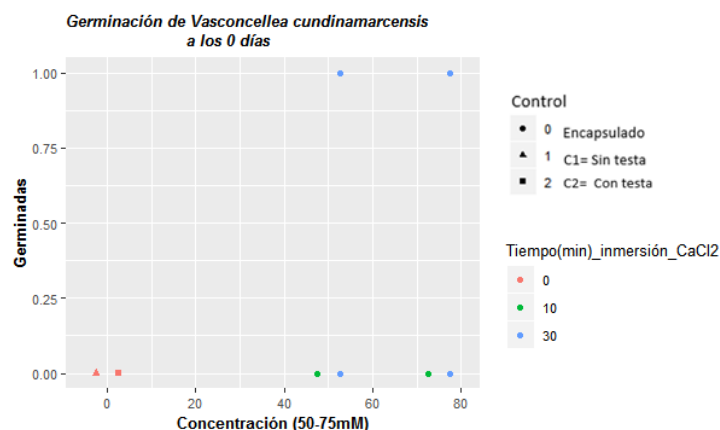
### INVERNADERO

B

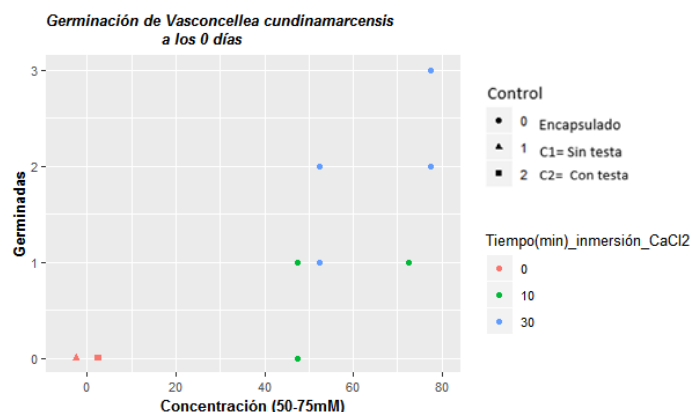


**Anexo 29.** Porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de las especies *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Hyeronima macrocarpa* en los 2 ambiente (cámara germinadora e invernadero) sobre los días de almacenados (0,20 y 40 días).

### CAMARÁ GERMINADORA

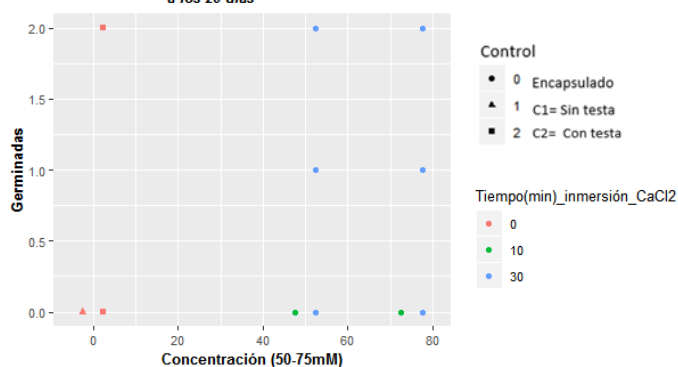


### INVERNADERO

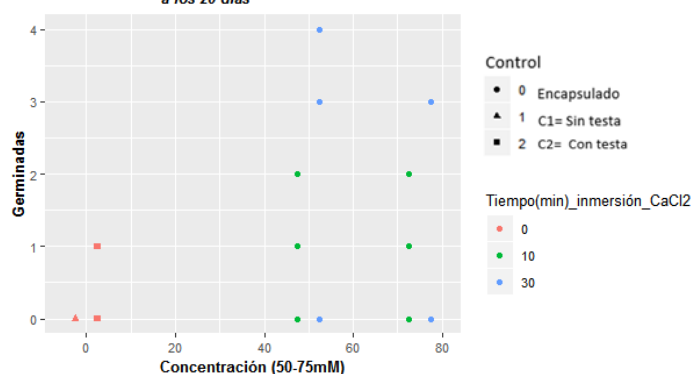




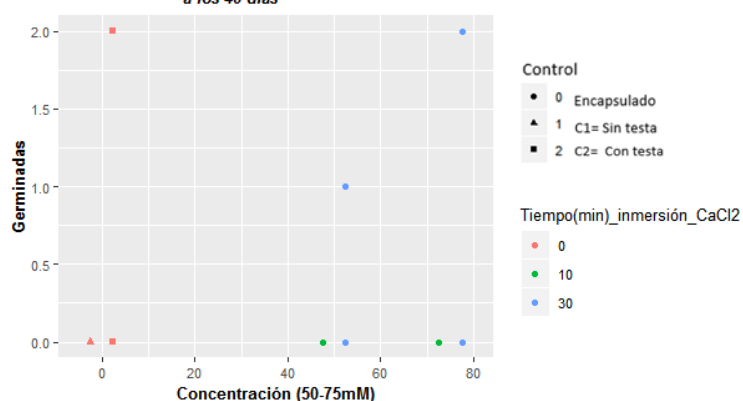
Germinación de *Vasconcellea cundinamarcensis*  
a los 20 días



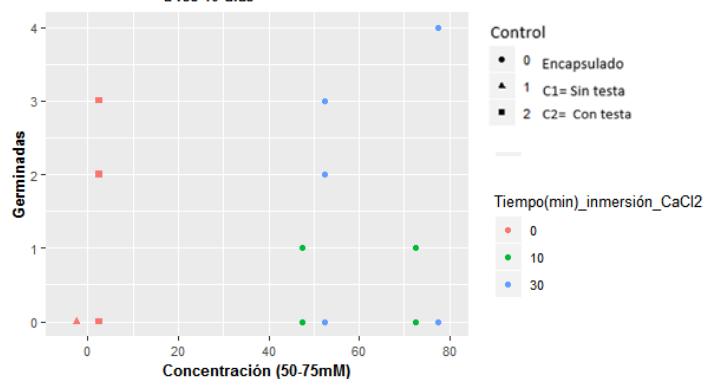
Germinación de *Vasconcellea cundinamarcensis*  
a los 20 días



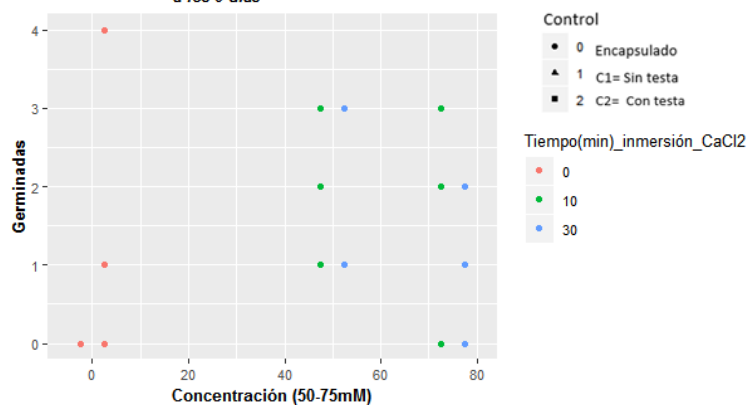
Germinación de *Vasconcellea cundinamarcensis*  
a los 40 días



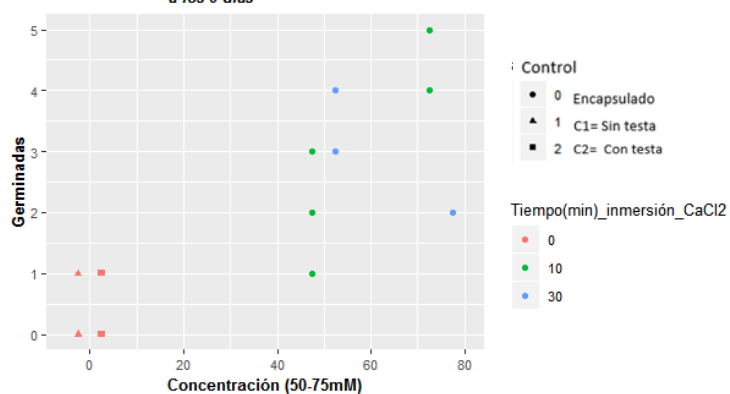
Germinación de *Vasconcellea cundinamarcensis*  
a los 40 días



Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 0 días

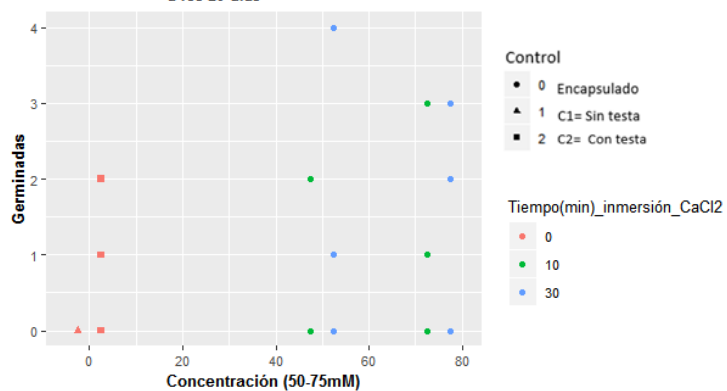


Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 0 días

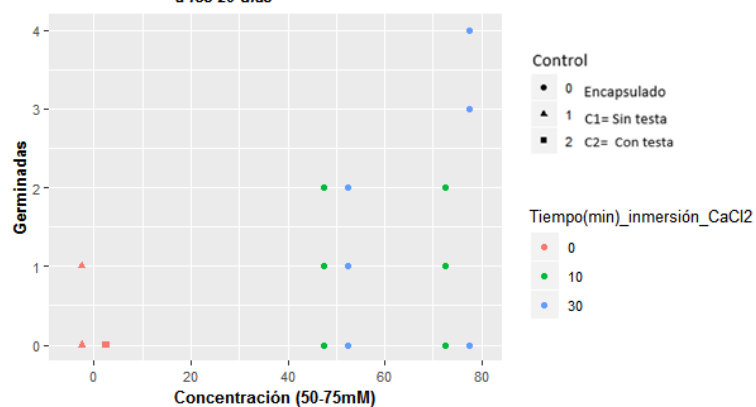




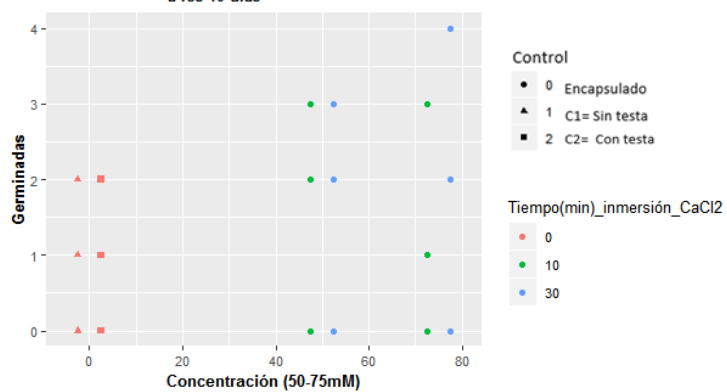
Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 20 días



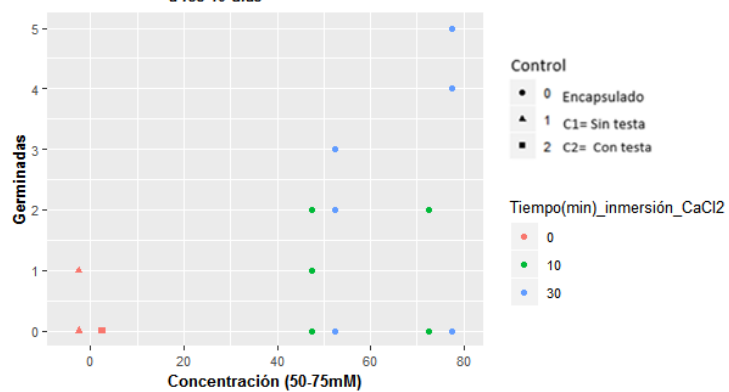
Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 20 días



Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 40 días



Germinación de *Hyeronima macrocarpa*  
a los 40 días



**Anexo 30.** Fotografías de la Investigación.



**Foto 1.** Recolección de la semilla  
*Hyeronima macrocarpa*



**Foto 2.** Recolección de la semilla  
*Vasconcellea cundinamarzensis*.



**Foto 3.** Peso de las semillas para  
calcular el CH.



**Foto 4.** Peso de las semillas para  
calcular el CH.





**Foto 5.** Viabilidad de las semillas  
*Hyeronima macrocarpa*



**Foto 6.** Viabilidad de las semillas  
*Vasconcellea cundinamarcensis*.



**Foto 7.** Preparación de soluciones



**Foto 8.** Desinfección de semillas



**Foto 9.** Lavado de semillas en la Cámara de Flujo



**Foto 10.** Extracción de embriones para colocar en Alginato de Sodio



**Foto 11.** Depósito de los embriones en las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$



**Foto 12.** Colocación de los embriones en los tubos de ensayo





**Foto 13.** Almacenamiento de los embriones encapsulados en los diferentes periodos



**Foto 14.** Siembra de los embriones encapsulados



**Foto 15.** Toma de datos



**Foto 16.** Toma de datos